

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA - PROPOSIÇÃO DE UM MODELO
ANIMAL EM RATOS PARA AVALIAÇÃO PREDITIVA DA
BIODISPONIBILIDADE DE FORMULAÇÕES CONTENDO
NIMESULIDA EM HUMANOS**

MICHELINE POSTALI

Toledo, PR, Brasil

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL**

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA - PROPOSIÇÃO DE UM MODELO
ANIMAL EM RATOS PARA AVALIAÇÃO PREDITIVA DA
BIODISPONIBILIDADE DE FORMULAÇÕES CONTENDO
NIMESULIDA EM HUMANOS**

MICHELINE POSTALI

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Farmacologia
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Anicleto Poli

Coorientadora: Dr^a. Josélia Larger Manfio

Toledo, PR, Brasil

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus...

Aos meus pais, Rubens e Beatriz, assim como ao meu irmão Rubens, pelo exemplo de caráter e profissionalismo, além de amor e incentivo sempre presentes.

Agradeço ao meu companheiro Glauber e ao meu filho Bruno pela compreensão e carinho que tiveram durante este período.

Em especial ao orientador Prof. Dr. Anicleto Poli, pela oportunidade de aprendizado, dedicação e confiança durante estes anos de trabalho.

Em especial a co-orientadora Dr^a. Josélia Larger Manfio pela oportunidade e incentivo para que este projeto se realizasse.

As minhas colegas Fabiane e Mariely, pela parceria, força e amizade em todas as horas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

A legislação brasileira estabelece que para um medicamento ser registrado como genérico, é necessário que se comprove sua equivalência e bioequivalência farmacêutica em relação ao medicamento de referência indicado pela ANVISA. Para comprovação de bioequivalência são analisados entre as formulações os parâmetros farmacocinéticos de $C_{\text{máx}}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\text{inf}}$. A principal via de administração avaliada neste aspecto é a oral, onde basicamente, o fármaco precisa se solubilizar em fluídos gastrointestinais e permear as membranas biológicas, para ser absorvido. Dados de solubilidade e de permeabilidade de fármacos são distribuídos em quatro classes de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, que estima a correlação *in vitro/in vivo* de cada classe. Tendo em vista que os ensaios *in vitro* simulam, porém não predizem resultados de bioequivalência, o modelo animal pode ser a alternativa mais viável a ser utilizada para prever comportamento de formulações em humanos. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo de bioequivalência de formulações contendo Nimesulida (classe II) em ratos para avaliar a confiabilidade do modelo animal para prever a bioequivalência deste fármaco em humanos. Para isso, foram utilizadas formulações previamente submetidas a estudos de bioequivalência em humanos, para avaliar a reprodutibilidade dos parâmetros farmacocinéticos. O experimento foi realizado em ratas *Wistar*, através de administração oral dos fármacos e posteriores coletas sanguíneas, as quais tiveram suas concentrações determinadas pelo método de CL-EM/EM, previamente validado. Os resultados foram tratados estatisticamente e os parâmetros farmacocinéticos avaliados quanto a bioequivalência. Para a formulação bioequivalente em humanos os resultados obtidos em ratos indicaram a não-bioequivalência das formulações. Em adição, para a formulação não-bioequivalente em humanos os dados de concentração plasmática não permitiram calcular os parâmetros farmacocinéticos, ficando este estudo prejudicado. Assim concluiu-se que o protocolo experimental não foi capaz de prever com segurança o comportamento *in vivo* do fármaco Nimesulida. Entretanto, é possível que estudos complementares possam revelar informações adicionais que conduzam a uma conclusão diferente.

Palavras-chave: nimesulida, bioequivalência, farmacocinética, modelo animal.

ABSTRACT

Brazilian law stipulates that for a medicine to be registered as a generic, it is necessary to prove their equivalence and bioequivalence studies compared with pharmaceutical drug reference indicated by ANVISA. Pharmacokinetic parameters of C_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ are examined to prove bioequivalence between the formulations. Oral is the main route of administration evaluated in this aspect, which basically needs to solubilize the drug in gastrointestinal fluids and permeate the biological membranes to be absorbed. Data on solubility and permeability of drugs are divided into four classes according to the Biopharmaceutics Classification System, which estimates the in vitro / in vivo correlation of each class. As the in vitro tests simulate, but don't predict the results of bioequivalence, the animal model may be the most viable way to predict behavior of formulations in humans. This paper aimed to conduct a study of bioequivalence of formulations containing Nimesulide (class II) in rats to evaluate the reliability of the animal model to predict the bioequivalence of the drug in humans. So, formulations previously undergone bioequivalence studies in humans to evaluate the reproducibility of pharmacokinetic parameters were used. The experiment was performed in female *wistar* rats by oral administration of drugs and subsequent blood collections, which had their concentrations determined by the method of LC-MS/MS previously validated. The results were statistically analyzed and the pharmacokinetic parameters assessed for bioequivalence. For the formulation bioequivalent in humans the results obtained in rats indicated the non-bioequivalence of the formulations. In addition, for non-bioequivalent formulation in human plasma concentration data failed to calculate the pharmacokinetic parameters becoming this study affected. Thus it was concluded that the experiment model was not able to predict for sure the in vivo behavior of the drug Nimesulide. However, it is possible that further studies could lead to a different conclusion.

Key-words: nimesulide, bioequivalence, pharmacokinetic, animal model.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Tipo de teste realizado por registro.	17
Figura 2 - Número de registros de medicamentos genéricos por ação geral do medicamento.	18
Figura 3 - Estrutura química da Nimesulida.	19
Figura 4 - Representação das classes do SCB.	21
Figura 5 - Cromatograma de CL-EM/EM de plasma contendo NMS e Clortalidona.	38
Figura 6 - Perfil de Dissolução da formulação NBE.	40
Figura 7 - Perfil de Dissolução da formulação BE.	40
Figura 8 - Perfil de Dissolução da formulação NBE (análise estabilidade).	41
Figura 9 - Curva das concentrações plasmáticas médias de Nisulid® e NMS em humanos (estudo BE).	44
Figura 10 - Curva das concentrações plasmáticas médias de Nisulid® e NMS em humanos (estudo NBE).	47
Figura 11 - Curva das concentrações plasmáticas de Nisulid® e NMS em ratas (estudo BE).	50
Figura 12 - Curva das concentrações plasmáticas de Nisulid® e NMS em ratas (estudo NBE).	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Expectativa de correlação <i>in vitro/in vivo</i> .	22
Tabela 2 - Sequência de administração e coleta sanguínea das ratas em cada experimento.	31
Tabela 3 – Esquema de identificação das ratas utilizadas nos experimentos.	32
Tabela 4 - Dados Farmacocinéticos obtidos em Humanos (BE).	45
Tabela 5 - Intervalos de Confiança Paramétricos para a Razão das Médias das Formulações Teste e Referência (estudo BE).	46
Tabela 6 - Dados Farmacocinéticos obtidos em Humanos (NBE).	48
Tabela 7 - Intervalos de Confiança Paramétricos para a Razão das Médias das Formulações Teste e Referência (NBE).	49
Tabela 8 - Dados Farmacocinéticos obtidos em ratas (BE).	51
Tabela 9 - Intervalos de Confiança Paramétricos para a Razão das Médias das Formulações Teste e Referência (BE).	52

LISTA DE ABREVIATÖES E SÍMBOLOS

AINE – Antiinflamatório Não esteroidal

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC – Área sob a curva

BE – Bioequivalente

°C – Grau Celsius (centígrado)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CIVIC – Correlação in vitro in vivo

CL – EM/EM – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

C_{máx} – Maior concentração do fármaco

COX – Cicloxigenase

CV – Coeficiente de Variação

FDA - Food and Drug Administration

g - Grama

IC – Intervalo de Confiança

Kg - Kilograma

µL – Microlitro

mg - Miligrama

mL – Mililitro

NMS – Nimesulida

ng – Nanograma

R – Medicamento Referência

RPM – Rotações por minuto

SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

T – Medicamento Teste

t_{1/2} – Tempo de meia-vida de eliminação

T_{máx} – Tempo onde ocorreu o C_{máx}

UI – Unidades Internacionais

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 PROTOCOLO CLÍNICO	30
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	30
3.3 METODOLOGIA ANALÍTICA	33
3.3.1 Análise das amostras	33
3.3.2 Instrumental utilizado	34
3.3.3 Condições Cromatográficas para análise em plasma de humano e de rato	34
3.3.4 Drogas, reagentes e soluções	34
3.3.4.1 Drogas Padrões	34
3.3.4.2 Produtos Farmacêuticos	35
3.3.4.3 Reagentes e solventes	35
3.3.4.4 Soluções Padrões	35
3.3.5 Procedimentos	35
3.3.5.1 Extração das amostras	36
3.3.5.2 Curva de calibração	36
3.3.5.3 Cálculo das concentrações	36
3.3.6 Validação dos Métodos Analíticos	37
3.4 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA E ESTATÍSTICA	37

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 MÉTODO BIOANALÍTICO	38
4.1.1 Validação	38
4.1.2 Perfis de Dissolução de Nimesulida	39
4.1.2.1 Perfil de Dissolução formulação NBE	40
4.1.2.2 Perfil de Dissolução formulação BE	40
4.1.2.3 Perfil de Dissolução formulação NBE	41
(análise estabilidade)	
4.1.3 Quantificação das amostras	42
4.2 DADOS DOS ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS	43
4.2.1 Estudo de bioequivalência em Humanos	43
4.2.1.1 Formulação BE em humanos	44
4.2.1.2. Formulação NBE em humanos	46
4.2.2 Estudo de bioequivalência em Animais	49
4.2.2.1 Formulação BE em humanos	49
4.2.2.2. Formulação NBE em humanos	53
5 CONCLUSÃO	59
6 REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

O setor farmacêutico no Brasil recebeu em fevereiro de 1999, com a aprovação da Lei 9.787 pelo Congresso Nacional que regulamenta a comercialização de medicamentos Genéricos, um grande estímulo para o surgimento e desenvolvimento de grandes indústrias dedicadas a comercialização quase que exclusiva, desta classe de medicamentos. Ainda em decorrência desta Lei, houve a necessidade de apoio a criação de centros dedicados à pesquisa clínica, especialmente aqueles voltados para o desenvolvimento de estudos de bioequivalência, muitos deles apoiados pelo Ministério da Saúde (CALIXTO & SIQUEIRA, 2008).

O medicamento genérico é um produto similar a um produto de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária, ou de outros direitos de exclusividade (BRASIL, 1999).

A legislação brasileira, tendo como base a regulamentação técnica e a experiência de diversos países na área de medicamentos genéricos, estabelece que para um medicamento ser registrado como genérico, é necessário, que se comprove sua equivalência e bioequivalência farmacêutica (mesma biodisponibilidade) em relação ao medicamento de referência indicado pela ANVISA (BRASIL, 2007; STORPIRTIS et al., 2004).

Equivalentes Farmacêuticos são medicamentos que possuem mesma forma farmacêutica, mesma via de administração e mesma quantidade da mesma substância ativa, isto é, mesmo sal ou éster da molécula terapêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos, desde que bem estabelecidos para a função destinada. O estudo de Equivalência Farmacêutica é um conjunto de ensaios físico-químicos, microbiológicos e biológicos, quando aplicáveis, que comprovam que dois medicamentos são Equivalentes Farmacêuticos, realizados anteriormente ao estudo de bioequivalência (BRASIL, 2010).

Diferentemente dos ensaios de Equivalência Farmacêutica, que são realizados *in vitro*, os estudos de Bioequivalência são realizados em voluntários (*in vivo*), selecionados aleatoriamente a receber por dois períodos distintos, dois tratamentos, ou seja, a formulação teste e a formulação referência, cujo Protocolo Clínico foi previamente aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (BRASIL, 2002).

A intercambialidade, ou seja, a segura substituição do medicamento de referência pelo seu genérico é assegurada por testes de bioequivalência apresentados à Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

A biodisponibilidade é considerada como a taxa e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação. A biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo. Para avaliação de biodisponibilidade considera-se a quantidade do fármaco contida no fluido biológico equivalente à disponível no sítio de ação. Dois medicamentos são considerados bioequivalentes, quando possuem biodisponibilidades semelhantes (BRASIL, 2002).

Os critérios para considerar dois produtos bioequivalentes é que eles tenham os parâmetros farmacocinéticos de $C_{\text{máx}}$, ASC_{0-t} (t refere-se ao último tempo de coleta sanguínea) e $ASC_{0-\text{inf}}$, com as razões das médias geométricas entre 80 e 125% considerando um intervalo de confiança de 90%. Por $C_{\text{máx}}$ entende-se como a concentração máxima alcançada pelo fármaco e a Área sob a curva, ASC (ou AUC), mede a extensão da absorção ou o montante total de fármaco absorvido pelo organismo, após a administração de dose única de um medicamento (BRASIL, 2003b; BRASIL, 2006).

A razão fundamental para a realização do teste de bioequivalência é assegurar a qualidade de medicamentos genéricos e estabelecer que não há diferenças entre a segurança e eficácia clínica em relação ao produto inovador, garantindo assim sua equivalência terapêutica. Basicamente, a bioequivalência atua como substituta da comprovação de equivalência terapêutica (NATION & SANSOM, 1994). Assim, dois medicamentos são considerados bioequivalentes quando as suas concentrações sanguíneas em função do tempo (biodisponibilidade), a partir da mesma dose molar, são tão semelhantes que é improvável que eles sejam capazes de produzir diferenças clinicamente relevantes na terapêutica e/ou efeitos adversos (LOBENBERG & AMIDON, 2000).

Dados da ANVISA, referentes a comercialização dos genéricos no Brasil, no ano de 2011, revelam que o número de registros desta classe de medicamentos chegou a 3101, gerando um total de 17312 apresentações comerciais, distribuídas entre 101 Laboratórios fabricantes (BRASIL, 2011).

Do total de registros de medicamentos genéricos concedidos, somente 38% deles envolveram estudos de bioequivalência (figura 1).

Um número bem mais expressivo (62%) de registros autorizados se referem a formas farmacêuticas isentas do teste de biodisponibilidade relativa/bioequivalência para os quais apenas os estudos de equivalência farmacêutica são exigidos (BRASIL, 2011).



Figura 1: Tipo de teste realizado por registro (BRASIL, 2011).

Entre os fármacos registrados, a Nimesulida conta com 28 registros de medicamentos genéricos, distribuídos entre as formas farmacêuticas Comprimido, Suspensão Oral e Gel Dermatológico, concedidos a 19 indústrias farmacêuticas. Pertencente a classe representada na figura 2 como fármaco utilizado para Dor/Inflamação/Febre, o composto colabora com a expressiva participação de 24,67% do total de registros, destinados à fármacos com função antiinflamatória (BRASIL, 2011).

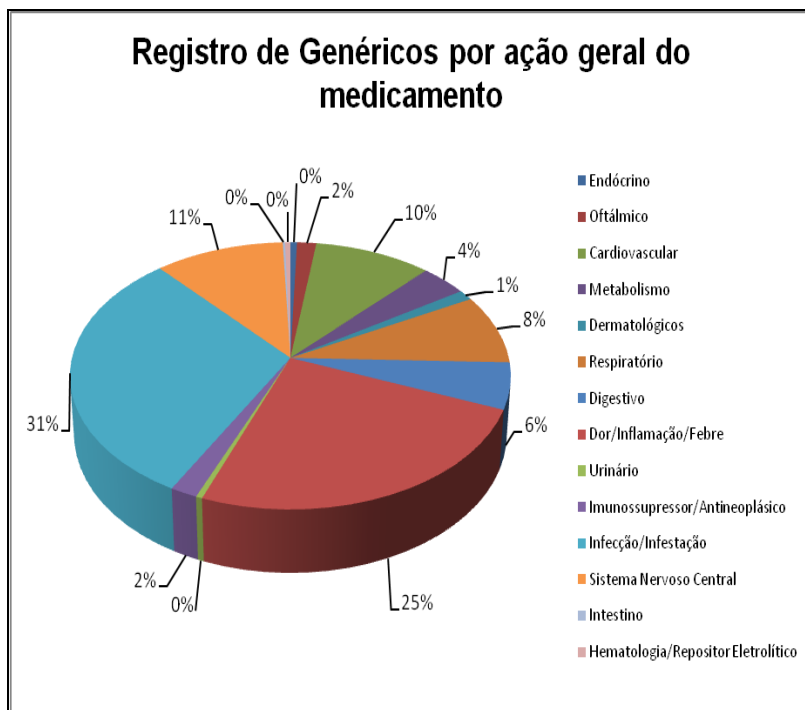


Figura 2: Número de registros de medicamentos genéricos por ação geral do medicamento (BRASIL, 2011).

A Nimesulida (4'-nitro-2'-fenoximetanosulfonânida, NMS) é um fármaco antiinflamatório não esteróide (AINE) que pertence à classe das sulfonânidas com efeitos antiinflamatório, antipirético e analgésico. Atualmente, a Nimesulida é comercializada como Nisulid®, Comprimido com 100 mg, pela empresa Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. A estrutura química da NMS está representada pela figura 3.

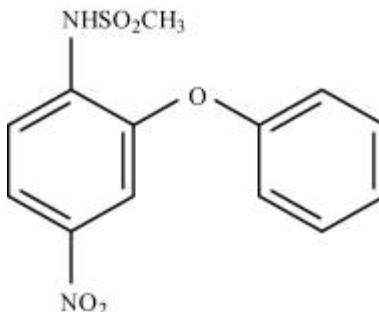


Figura 3: Estrutura química da Nimesulida (MARTINO et al., 2007).

A NMS é tão eficaz quanto os demais AINES clássicos, porém com a vantagem de apresentar baixa incidência de efeitos colaterais. A dosagem normalmente administrada a adultos é de 100 mg duas vezes ao dia (BERNAREGGI, 2001).

A NMS é um inibidor da cicloxigenase (COX) que é a enzima que catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandina. Existem duas isoformas da COX, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 atua na manutenção da integridade da mucosa do estômago, uma vez que produz prostaglandinas com efeito gastro-protetor, e já a COX-2 participa dos processos inflamatórios. Os AINES que atuam de forma não seletiva, ou seja, inibindo a COX-1 e a COX-2, não apresentam a função protetora oferecida pela COX-1. Acredita-se que este seja o fenômeno envolvido com os efeitos gastrintestinais indesejáveis desta classe de medicamentos. Fármacos como a NMS, que inibem seletivamente a COX-2, tem a vantagem de apresentar menor incidência de efeitos gastrintestinais. (GILROY, 1998; GOODMAN & GILMAN, 2006; KATZUNG, 2006; KURUMBAIL, 2001).

Além disso, foi demonstrado que a NMS possui muitas outras propriedades bioquímicas que provavelmente são responsáveis pelas suas propriedades clínicas. Estas incluem: inibição da fosfodiesterase tipo IV, redução da formação do ânion superóxido (O_2^-), “*scavenging*” do ácido hipoclorídrico, inibição de proteinases (elastase, collagenase), prevenção da inativação do inibidor da alfa-1-protease, inibição da liberação de histamina dos basófilos e mastócitos humanos e inibição da atividade da histamina (MOFFAT, 2004).

A NMS é bem absorvida quando administrada por via oral. Após uma única dose de 100 mg, um pico de concentração plasmática de 3 a 4 mg/l é alcançado em adultos após 2 a 3 horas. Nenhuma

diferença estatística significativa tem sido encontrada entre estes números e aqueles vistos após a administração de 100 mg duas vezes ao dia por 7 dias. Mais de 97,5% do fármaco se liga às proteínas plasmáticas (SILVA, 2006).

A fração livre de NMS no soro é de aproximadamente 1%, devido a alta interação com a albumina (BERNAREGGI, 2001). O volume de distribuição em adultos é 0,18 a 0,39 l/kg (SILVA, 2006).

Estudos de bioequivalência mostraram que a taxa e extensão de absorção de NMS é similar quando administrada sob a forma de suspensão ou comprimido. A presença de alimentos interfere na absorção de NMS. Estudos mostram que após a refeição, o $C_{\text{máx}}$ da NMS reduziu em aproximadamente 20% em relação ao obtido em estado de jejum. Já para os parâmetros de $T_{\text{máx}}$ e ASC, a ingestão de alimentos não apresentou interferência (BERNAREGGI, 2001).

A NMS é metabolizada no fígado e o seu metabólito principal, a hidroxinimesulida, também é farmacologicamente ativo. O intervalo para aparecimento deste metabólito na circulação é curto (cerca de 0,8 horas) mas a sua constante de formação não é alta e é consideravelmente menor que a constante de absorção da NMS. Apenas 1 a 3% da NMS é excretada como composto inalterado (MOFFAT, 2004).

A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) é de cerca de 4 horas, que ocorre basicamente de transformações metabólicas (quase que exclusivamente eliminado por metabolismo hepático), onde a eliminação na urina e fezes é insignificante. Não foram observadas diferenças metabólicas entre homens e mulheres (BERNAREGGI, 2001).

A NMS apresenta cinética linear até a concentração de 100 mg. Após administração única ou múltipla de NMS em homens e mulheres, observa-se que os parâmetros farmacocinéticos são semelhantes, concluindo que não há diferenças influenciadas pelo gênero. As interações farmacológicas pesquisadas não apresentam relevância clínica (BERNAREGGI, 2001).

A NMS pertence, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, à classe II, ou seja, com características de baixa solubilidade e alta permeabilidade (BERNAREGGI, 2001).

Para a compreensão do processo de absorção, AMIDON em 1995 propôs o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) que consiste na avaliação dos parâmetros de solubilidade aquosa e de permeabilidade intestinal de fármacos, características cuja avaliação é fundamental para determinação das propriedades físico-químicas, que influenciam diretamente na biodisponibilidade do medicamento

(MILANI et al., 2009). O Sistema de Classificação Biofarmacêutica distribui os fármacos, conforme suas características de solubilidade e permeabilidade, em quatro classes, conforme representado pela figura 4 (WU & BENET, 2005).

	Alta Solubilidade	Baixa Solubilidade
Alta Permeabilidade	CLASSE 1 Alta Solubilidade Alta Permeabilidade	CLASSE 2 Baixa Solubilidade Alta Permeabilidade
Baixa Permeabilidade	CLASSE 3 Alta Solubilidade Baixa Permeabilidade	CLASSE 4 Baixa Solubilidade Baixa Permeabilidade

Figura 4: Representação das classes do SCB (WU & BENET, 2005).

Levando em consideração que o teste de Bioequivalência é realizado com fármacos que necessitam ser absorvidos para o alcance da circulação sanguínea, basicamente, as formas farmacêuticas predominantes neste aspecto, são as administradas por via oral. Dados do *IMS Health* (2001) apontam que 84% dos tratamentos realizados nos USA e na Europa, utilizam a administração oral de medicamentos (LENNERNAS & ABRAHAMSSON, 2005).

A administração oral é considerada segura, eficiente e de fácil acesso com o mínimo de desconforto para o paciente em comparação com outras vias de administração, tais como via intramuscular, subcutânea, retal e pulmonar. No entanto, apesar da comodidade, muitos dos mecanismos de absorção da droga após a administração oral ainda não foram totalmente caracterizados. Por exemplo, o fármaco necessita ser absorvido no estômago e no intestino e suas propriedades físico-químicas podem limitar este processo. Além disso, o fármaco passa pelo fígado onde pode ser metabolizado e/ou excretado antes de alcançar a

circulação sistêmica, resultando em irregularidades na absorção (GOODMAN & GILMAN 2006; LENNERNAS, 2007).

Para melhor entendimento do processo de absorção dos medicamentos, deve-se ter claro os conceitos de solubilidade e de permeabilidade dos compostos. A primeira etapa deste processo é a solubilização do medicamento que inicia com a desintegração da forma farmacêutica em partículas menores e finalizando com a dissolução do fármaco nos fluídos biológicos. Não menos importante, a permeabilidade constitui a próxima etapa que resulta na absorção do fármaco dissolvido. Por permeabilidade entende-se como a capacidade do fármaco ultrapassar as membranas biológicas.

A dissolução gastrointestinal e a permeação da droga na mucosa são as principais propriedades que influenciam na absorção dos fármacos. Estas propriedades, combinadas pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica, orientam as características de absorção do fármaco, baseado no comportamento físico-químico e fisiológico (LOBENBERG & AMIDON, 2000).

A tabela 1 mostra a correlação que AMIDON et al. em 1995 estabeleceram entre as classes e as respectivas expectativas de correlação *in vitro/in vivo*, baseado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Tabela 1: Expectativa de correlação *in vitro/in vivo*.

Classe	Expectativa de Correlação <i>in vitro/in vivo</i>
I	Há correlação <i>in vitro/in vivo</i> se a velocidade de dissolução for mais lenta que a velocidade de esvaziamento gástrico. Caso contrário, a correlação é limitada ou inexistente.
II	Correlação <i>in vitro/in vivo</i> é esperada se a velocidade de dissolução <i>in vitro</i> é similar à <i>in vivo</i> .
III	A permeabilidade é a etapa determinante da velocidade de absorção e a correlação é limitada ou inexistente.
IV	Correlação <i>in vitro/in vivo</i> limitada ou inexistente.

AMIDON et al., 1995; EMAMI, 2006; FLACH & DALLA COSTA, 1999

Para AMIDON et al. (1995), as seguintes características são esperadas dos fármacos pertencentes a cada classe:

CLASSE 1: Este é o caso onde a droga é bem absorvida (embora a sua disponibilidade sistêmica pode ser baixa, devido ao metabolismo de primeira passagem) e a etapa limitante da taxa de absorção do fármaco é a sua taxa de dissolução ou de esvaziamento gástrico. Neste caso, o perfil de dissolução deve ser bem definido e reproduzível para assegurar a biodisponibilidade. Para formas farmacêuticas de liberação imediata que se dissolvem com muita rapidez, a taxa de absorção será controlada pela taxa de esvaziamento gástrico e nenhuma correlação com a taxa de dissolução é esperada. No estado de jejum a taxa de esvaziamento gástrico tem um tempo médio entre 5 e 22 min, e uma média de 12 a 22 min para volumes administrados de 50 e 200 ml, respectivamente. Isto sugere que uma especificação de dissolução para formas farmacêuticas de liberação imediata de dissolver 85% em menos de 15 minutos pode assegurar bioequivalência (AMIDON et al., 1995).

CLASSE 2: Esta é a classe de drogas para o qual o perfil de dissolução deve ser mais claramente definido. Mais precisamente, este é o caso onde a absorção é alta e a dissolução é baixa. A dissolução da droga *in vivo* é, portanto, o passo limitante da absorção da droga que geralmente é mais lenta do que para a classe 1. O perfil de dissolução *in vitro* deve ser determinado por pelo menos 4-6 pontos até atingir a taxa de 85% de dissolução em vários pH's fisiológicos. Drogas desta classe podem vir a ter absorção variável devido à formulação e à variáveis *in vivo* que podem afetar o perfil de dissolução. Meios de dissolução e métodos que refletem o processo *in vivo*, são particularmente importantes neste caso, para obter correlações “*iviv*” (AMIDON et al., 1995).

Esta classe apresenta baixa biodisponibilidade após administração oral de formulações, o que contribui para uma biodisponibilidade variável (BERNAREGGI, 2001).

CLASSE 3: Para esta classe de fármacos, a permeabilidade é o passo limitante na absorção da droga. Tanto a taxa e extensão da

absorção da droga pode ser altamente variável para esta classe de droga, mas se a dissolução for rápida com 85% de fármaco dissolvidos em menos de 15 minutos esta variação poderá ser devido ao trânsito gastrointestinal variável, conteúdo intestinal e permeabilidade da membrana ao invés de fatores da forma farmacêutica (AMIDON et al., 1995).

CLASSE 4: Esta classe de medicamentos apresenta problemas significativos para a absorção oral eficaz. O número de medicamentos que se enquadram nesta categoria dependerá dos limites precisos utilizados para a classificação de permeabilidade e solubilidade (AMIDON et al., 1995).

A dissolução do fármaco, compreendida como a taxa de liberação do princípio ativo de sua forma farmacêutica deve ser investigada, principalmente para drogas pouco solúveis, pois a taxa de liberação pode ser limitada, devido ao volume e pH do fluido intestinal. Por outro lado, a presença de sais biliares pode auxiliar na solubilização de drogas lipofílicas assim como os alimentos podem influenciar tanto na solubilidade como na permeabilidade de fármacos (LOBENBERG & AMIDON, 2000).

O ensaio de dissolução descrito nas farmacopeias é um teste simples, utilizando geralmente um meio composto de tampão aquoso, que na verdade não é capaz de refletir o que acontece *in vivo* com uma droga no estado sólido. Assim, a fim de desenvolver uma forma mais preditiva de correlação *in vitro* - *in vivo* (CIVIV) para ser utilizado como modelo para uso em desenvolvimento de medicamentos, é necessário a utilização de um meio bio-relevante capaz de simular o comportamento nos fluidos gastrintestinais com maior precisão (GHAZAL et al., 2009).

GHAZAL et al. (2009) estudaram perfis de dissolução do Itraconazol, um fármaco de classe II que apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade, com meios bio-relevantes. Para que a composição destes meios pudesse trazer resultados muito próximos aos encontrados *in vivo*, foi adicionado à tampões convencionais, substâncias como proteínas e carboidratos, capazes de simular estados de jejum e alimentado. Como resultados, obtiveram curvas que demonstraram a influência do pH na dissolução do fármaco, assim como o aumento da biodisponibilidade do Itraconazol, quando administrado concomitantemente a uma refeição, especialmente rica em gordura.

PANCHAGNULA & THOMAS (2000) descrevem vários fatores que são capazes de afetar a dissolução, absorção e biodisponibilidade de fármacos:

- Características físico-químicas da droga: Solubilidade; Coeficiente de Partição, pka; Taxa de dissolução; Formação do sal; Pro-drogas; Granulometria, Área superficial; Polimorfismo e Fatores Estereoquímicos.
- Características da Forma Farmacêutica: Fatores relacionados à formulação (excipientes); Forma Farmacêutica; Processo de Fabricação; Estabilidade e armazenamento.
- Características fisiológicas que afetam a biodisponibilidade: Permeabilidade; Trânsito e motilidade Gastrointestinal; Metabolismo Hepático; Excreção biliar; Excreção renal e Ligação à proteínas.

A solubilidade de uma substância é considerada alta, de acordo com critérios do FDA, quando a sua maior dose administrada por via oral é solúvel em até 250 mL de meio, na faixa de pH entre 1,0 e 7,5 a 37 °C. A determinação da solubilidade de equilíbrio deve ser determinada pelo método conhecido como *Shake Flask*, que emprega agitação e temperatura controlada, para extrapolar a porção solúvel do fármaco em função do tempo (WHO, 2005).

A eficácia de medicamentos pode ser extremamente limitada, pela baixa solubilidade em água, uma vez que a absorção da grande maioria dos medicamentos pelas membranas biológicas ocorre através da quantidade suficiente do fármaco em solução. As consequências da baixa solubilidade incluem a baixa biodisponibilidade e a alta variabilidade de concentrações da droga na corrente sanguínea (KAPSI & AYRES, 2001).

KAPSI e AYRES (2001) ainda citam inúmeras alternativas que se tem buscado para melhorar as taxas de dissolução da droga. Estas incluem:

- Redução do tamanho de partículas para aumento da área superficial;
- Utilização de sistemas de tensoativos;
- Formação de complexos solúveis em água;
- Utilização de pró-droga ou sais que possuam maior solubilidade.

MELLAERTS et al. (2008) acreditam que a maioria dos medicamentos inovadores, com baixa solubilidade em água, apresentam biodisponibilidade oral deficiente, devido a dissolução insuficiente ao longo do trato gastrointestinal. O desenvolvimento de estratégias para

superar essas desvantagens constitui atualmente um dos maiores desafios para os cientistas na investigação farmacêutica.

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de melhorar a solubilidade da NMS. SHOUKRI et al. (2009) desenvolveram uma formulação alternativa, de comprimidos utilizando gelatina, sorbitol e glicina com técnica de liofilização dos comprimidos e posterior adição de um polímero solúvel em água, visando melhorar a desintegração, dissolução e consequentemente a sua biodisponibilidade. No mesmo ano, MONEGHINI et al. testaram a irradiação de microondas, técnica que tem sido utilizada para alterar o estado cristalino de drogas, que provocou um aumento da solubilidade *in vitro*, tendo como principal vantagem, a ausência de solventes orgânicos, o que diminui os riscos provenientes de solventes residuais.

A solubilidade em água de uma molécula pode ser aumentada através da utilização de seus sais. A maneira mais fácil de se influenciar a solubilidade de compostos sensíveis ao pH, é a mudança do pH do meio de dissolução, e se esta característica for observada dentro da faixa de pH fisiológico, os dados de dissolução podem ser utilizados para estabelecer uma *correlação in vitro in vivo (CIVIV)*. A utilização de meios de dissolução com pH fora da faixa fisiológica, assim como de solventes orgânicos, não é recomendada, pois são incapazes de fornecer uma boa previsibilidade do desempenho *in vivo* de uma forma farmacêutica (LOBENBERG & AMIDON, 2000).

A permeabilidade pode ser avaliada por estudos farmacocinéticos (estudos de balanço de massa, por exemplo) ou métodos de permeabilidade intestinal, como perfusão intestinal em seres humanos ou animais, modelos de cultura celular como Caco-2, ou outro método validado. Estas técnicas demonstram a capacidade de permeação da droga, mas é válido lembrar que os compostos podem ter suas biodisponibilidades reduzidas substancialmente, pelo metabolismo de primeira passagem (WHO, 2005).

Além da possibilidade de avaliar as características que a formulação é capaz de desempenhar *in vivo*, os dados de solubilidade e de permeabilidade de fármacos podem ser utilizados para justificar uma bioisenção, ou seja, substituir o estudo de bioequivalência *in vivo*, pelos dados de solubilidade e de permeabilidade determinados *in vitro*. Embora os dados da solubilidade de fármacos e as características como o tamanho das partículas (entre outras propriedades físico-químicas) estão facilmente disponíveis, dados de permeabilidade são mais restritos, o que dificulta a previsibilidade do mecanismo de absorção de medicamentos (AMIDON et al., 1995).

Nos últimos anos, a aplicação da correlação *in vitro/in vivo*, tem sido um dos principais focos no desenvolvimento de produtos e otimização de processos, visando obter resultados que reflitam os dados de biodisponibilidade. A correlação é um termo empregado para descrever a relação que existe entre variáveis, ou interdependência de dados qualitativos e/ou quantitativos. Do ponto de vista biofarmacêutico, a correlação pode ser interpretada como a relação das características de liberação *in vitro* com os parâmetros de biodisponibilidade *in vitro*, permitindo sua previsibilidade (EMAMI, 2006).

As características do fármaco NMS tornam a sua biodisponibilidade de difícil estimativa. Com isso, surge a necessidade de se obter um método de avaliação dos parâmetros de solubilidade e de permeabilidade que mais se aproxime do resultado que poderá ser gerado em humanos. Tendo em vista que os ensaios *in vitro* simulam, porém não predizem resultados de bioequivalência, o modelo animal pode ser a alternativa mais precisa a ser utilizada, auxiliando na etapa de desenvolvimento de fármacos para aumentar as chances de uma Bioequivalência (STORPIRTIS et al., 2004).

A proposta de utilização de modelo animal vem de encontro com a necessidade de ferramentas capazes de demonstrar o comportamento *in vivo* do fármaco, visando auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de formulações.

Na descoberta de drogas e desenvolvimento pré-clínico, há uma grande necessidade da caracterização rápida e precisa dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco. Várias metodologias *in vitro* aumentaram significativamente a quantidade de dados experimentais gerados, porém, além destas técnicas, há uma forte necessidade de métodos que possam ser usados para prever com precisão as propriedades farmacocinéticas a partir de uma estrutura molecular (LENNERNAS, 2007).

Um modelo animal é um organismo vivo capaz de proporcionar o estudo e entendimento de fenômenos de interesse. Os resultados de um modelo animal podem servir para caracterizar um sistema, ou para prever o comportamento de outra espécie, atuando como uma representação de outro sistema em investigação (WALL & SHANI, 2008).

Toda atenção dispensada para o desenvolvimento de medicamentos genéricos leva ao oferecimento à população de medicamentos de melhor qualidade, mais seguros e eficazes; a disponibilidade de medicamentos de menor preço, visto que os

fabricantes de genérico não precisam investir em pesquisa para seu desenvolvimento e nem em propaganda; a redução do preço de medicamentos de referência com a entrada de medicamentos concorrentes (genéricos); a contribuição para o aumento do acesso aos medicamentos; o fortalecimento da indústria nacional; assim como o desenvolvimento tecnológico das indústrias, e consequentemente, do país (BRASIL, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo de bioequivalência de formulações contendo Nimesulida em ratos para avaliar a confiabilidade do modelo animal para prever a bioequivalência deste fármaco em humanos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar parcialmente a metodologia analítica para a determinação da Nimesulida em plasma de ratos tendo como base a validação analítica já realizada na Biocinese para a determinação desta droga em plasma humano;
- Realizar as análises de quantificação do fármaco em plasma de ratos, por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa – CL – EM/EM, de acordo com a metodologia co validada.
- Comparar os resultados farmacocinéticos já existentes em humanos com estes obtidos no modelo animal para concluir se este pode servir como ferramenta capaz de prever a bioequivalência em humanos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo clínico

A Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos, localizada na cidade de Toledo – Paraná, realizou dois estudos de bioequivalência do produto Nimesulida 100 mg Comprimido. O primeiro estudo realizado no ano de 2007 apresentou como resultado a não-bioequivalência (NBE) entre os medicamentos teste e referência. Já no ano de 2010, um novo estudo foi realizado cujo resultado foi a bioequivalência (BE) entre as formulações teste (T) e referência (R). Os dois estudos foram patrocinados pela mesma indústria farmacêutica, que tinha como objetivo registrar seu produto como medicamento genérico. Em cada um destes estudos foram utilizados 28 voluntários sadios, que receberam por dois períodos distintos, dois tratamentos (T e R).

3.2 Protocolo experimental

O experimento foi realizado de acordo com Protocolo previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Santa Catarina, sob número 23080.027314/2010-92 (Anexo I).

Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e o estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Fitoquímica da Universidade Paranaense – UNIPAR, Unidade Universitária de Toledo – PR.

Foram analisadas todas as formulações submetidas aos estudos em humanos, sendo 2 consideradas como medicamentos teste e outras 2 como medicamento de referência, do produto Nimesulida 100 mg Comprimido. As amostras foram identificadas como formulações T e R, pertencentes aos estudos NBE e BE que correspondem aos medicamentos teste e referência do estudo não-bioequivalente (2007) e bioequivalente (2010), respectivamente. Os lotes de cada formulação avaliada em ratos foram exatamente os mesmos utilizados no estudo de bioequivalência em humanos.

A administração dos medicamentos foi realizada em dose única, por via oral, pelo método de gavagem, na dosagem de 5,58 mg/kg de peso dos animais. A administração ocorreu no período da manhã, permitindo com que as coletas fossem realizadas ao longo do dia.

Vinte e quatro ratas saudáveis, da linhagem *wistar*, com peso entre 220 e 300 g e com 4 meses de idade foram utilizadas em cada estudo, totalizando 48 animais (24 no estudo NBE e 24 no estudo BE) para execução do experimento. Todas as ratas foram mantidas em gaiolas individuais de modo a permitir a identificação de cada uma, em relação ao peso, para administração e coletas sem equívocos.

Após jejum de 12 horas, tanto no estudo NBE quanto no BE, 12 ratas receberam o medicamento teste e as outras 12 receberam o medicamento referência. Destas 12 ratas de cada grupo, 6 foram utilizadas para as 5 primeiras coletas, e as outras 6 para as últimas 5 coletas, de modo que a cada 2 ratas formava-se uma curva de concentração em função do tempo (fase de absorção e de eliminação do fármaco). As coletas divididas entre os grupos foram definidas visando minimizar ao máximo o sofrimento dos animais. O mesmo procedimento foi adotado para execução do estudo NBE e BE. O esquema de coleta está mostrado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Sequência de administração e coleta sanguínea das ratas em cada experimento.

Ratas	Medicamento Administrado	Coletas
Ratas 1 a 6		
1 - 6	Nimesulida	00:20, 00:40, 01:00, 01:30 e 02:00
Ratas 7 a 12		
7 - 12	Nimesulida	02:30, 03:00, 04:00, 06:00 e 08:00
Ratas 13 a 18		
13 - 18	Nisulid®	00:20, 00:40, 01:00, 01:30 e 02:00
Ratas 19 a 24		
19 - 24	Nisulid®	02:30, 03:00, 04:00, 06:00 e 08:00

Tabela 3: Esquema de identificação das ratas utilizadas nos experimentos.

48 ratas			
<div>↙</div> <div>24 ratas estudo NBE (2007)</div>		<div>↘</div> <div>24 ratas estudo BE (2010)</div>	
<div>↙</div> <div>12 ratas teste</div> <div>↓</div>	<div>↘</div> <div>12 ratas referência</div> <div>↓</div>	<div>↙</div> <div>12 ratas teste</div> <div>↓</div>	<div>↘</div> <div>12 ratas referência</div> <div>↓</div>
Ratas 1 e 7 = curva 1	Ratas 13 e 19 = curva 1	Ratas 1 e 7 = curva 1	Ratas 13 e 19 = curva 1
Ratas 2 e 8 = curva 2	Ratas 14 e 20 = curva 2	Ratas 2 e 8 = curva 2	Ratas 14 e 20 = curva 2
Ratas 3 e 9 = curva 3	Ratas 15 e 21 = curva 3	Ratas 3 e 9 = curva 3	Ratas 15 e 21 = curva 3
Ratas 4 e 10 = curva 4	Ratas 16 e 22 = curva 4	Ratas 4 e 10 = curva 4	Ratas 16 e 22 = curva 4
Ratas 5 e 11 = curva 5	Ratas 17 e 23 = curva 5	Ratas 5 e 11 = curva 5	Ratas 17 e 23 = curva 5

Ratas 6 e 12 = curva 6	Ratas 18 e 24 = curva 6	Ratas 6 e 12 = curva 6	Ratas 18 e 24 = curva 6
---------------------------	----------------------------	---------------------------	----------------------------

As ratas foram contidas em contensores Insight® para facilitar o posicionamento das mesmas em ambiente aquecido. As coletas foram realizadas através de uma pequena incisão na cauda das ratas (uma única incisão em cada animal), permitindo a coleta de sangue seriada. Após a incisão da cauda, que permitiu a primeira coleta de sangue, as ratas foram posicionadas próximas à lâmpada incandescente de 110 watts, com temperatura aproximada de 37 °C, por um período entre 2 a 3 minutos para facilitar a vasodilatação e conseqüentemente a coleta sanguínea. A vasodilatação promovida e a remoção do coágulo com algodão embebido em heparina sódica diluída (50 UI/mL) permitiu novas coletas no local incisado. Amostras de sangue (200 µl) foram coletadas nos tempos 00:20, 00:40, 01:00, 01:30, 02:00, 02:30, 03:00, 04:00, 06:00 e 08:00, após administração de cada formulação, em tubos coletores contendo 10 µl de heparina sódica diluída (50 UI/mL), para evitar a coagulação das amostras.

Ao término do experimento, todos os animais foram submetidos à eutanásia por injeção intraperitoneal de dose supra anestésica de Tiopental, (150 mg/kg). A eutanásia, ou morte sem sofrimento, é considerada a forma correta de interromper procedimentos experimentais, ou ao final de uma experimentação, mesmo que bem sucedida. De um modo geral a eutanásia química deve ser o método de escolha. Estes métodos têm como base a aplicação de superdosagem de fármacos que gerem inconsciência (ausência de reflexo pupilar, caudal e outros) e analgesia rápida seguidas de parada cardio-respiratória. As substâncias mais comumente empregadas são os barbitúricos e os anestésicos. A via de administração mais eficaz é a endovenosa, podendo ser substituída pela via intraperitoneal nos casos de dificuldade de obtenção de acesso venoso. Considera-se que o método de escolha para a eutanásia de roedores seja a superdosagem de barbitúricos ou anestésicos (SILVA, 2008).

3.3 Metodologia analítica

3.3.1 Análise das amostras

As concentrações plasmáticas de NMS foram determinadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, cuja metodologia foi desenvolvida e validada, para realização dos estudos de bioequivalência em humanos, pela empresa Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos.

3.3.2 Instrumental utilizado

Para quantificação dos compostos, foi utilizado Cromatógrafo Líquido acoplado à Espectrometria de Massa (CL-EM/EM) *Waters*, modelo *Alliance 2695*, com coluna *Phenomenex C18* x 50 mm x 4,6 mm x 4,0 µm, a temperatura de 40 °C.

3.3.3 Condições cromatográficas para análise em plasma humano e de rato

A detecção no espectrômetro de massas dos compostos foi realizada por técnica de monitoramento de reação múltipla (MRM). As transições de massa/carga (m/z) monitoradas foram 307,3 > 229,3 m/z para NMS e 337,2 > 190,0 m/z para Clortalidona. Os compostos foram ionizados em modo negativo por fonte de eletronebulização e monitorados por analisador de quadrupolo sequencial (triplo-quadrupolo). Este sistema operou com voltagem do capilar de 4,5 KV, voltagem do cone de 40 V tanto para NMS quanto para Clortalidona; voltagem do hexapolo de 0,5 V; temperatura da fonte de 110 °C; temperatura de dessolvatação de 400 °C; fluxo do gás de dessolvatação de 700L/h; fluxo do gás do cone de 100L/h e pressão do gás de colisão (argônio) de $4,0 \times 10^{-3}$ mbar.

Como fase móvel foi utilizada Acetonitrila – Acetato de Amônio 10 mM (70:30). O volume de injeção foi de 10 µL a um fluxo de 0,6 mL/min obtendo uma corrida analítica de 2,5 minutos.

3.3.4 Drogas, reagentes e soluções

3.3.4.1 Drogas padrões

A Substância Química de Referência utilizada na curva de calibração foi a NMS proveniente da Farmacopéia Brasileira e como Padrão Interno, utilizado em todas as amostras, Clortalidona fornecido

pela Prochisa S.R. A Clortalidona foi definida como padrão interno por apresentar propriedades cromatográficas similares a NMS.

3.3.4.2 Produtos Farmacêuticos

Os medicamentos foram fornecidos pela Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos, uma vez que os lotes foram os mesmos dos utilizados para a realização dos estudos de Bioequivalência em humanos. Os medicamentos são denominados como teste (T), Nimesulida 100 mg Comprimido e de referência (R), Nisulid® 100 mg Comprimido, fabricado pelo Laboratório Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. Ressalta-se que o experimento foi realizado com 2 formulações teste (NBE e BE), e da mesma forma com o medicamento referência (NBE e BE).

Todos os medicamentos foram preparados da mesma maneira, iniciando-se pela maceração, pesagem e posterior diluição em água destilada, até obter uma concentração de 2 mg/mL. Os medicamentos foram preparados imediatamente antes da administração.

3.3.4.3 Reagentes e solventes

Para extração do ativo nas amostras sanguíneas e preparo de Fase Móvel, foram utilizados os reagentes Acetonitrila (J. T. Baker®), Acetato de Amônio (Carlo Erba®), Acetato de Etila (Vetec®), Hidróxido de Sódio (Vetec®) e Metanol (J. T. Baker®).

3.3.4.4 Soluções padrões

As Soluções padrões de NMS e de Clortalidona foram preparadas a uma concentração de 1.000 µg/mL e 10.000 µg/mL respectivamente diluídos com Metanol e armazenados sob refrigeração.

3.3.5 Procedimentos

Após a coleta sanguínea, com volume de 200 µl cada, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos, e o plasma resultante (aproximadamente 100 µl) foi coletado e armazenado em freezer a - 20 °C até o momento da análise de quantificação do fármaco. Realizou-se o descongelamento das amostras a temperatura ambiente,

agitou-se por 5 segundos com movimentos circulares verticais, o volume de amostra utilizado foi de 50 µL, adicionou-se 50 µL de padrão interno (Clortalidona a 10.000 ng/mL), 50 µL de Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,01N e agitou-se por 1 minuto. Foi adicionado 1.500 µl de Acetato de Etila e novamente agitado por 15 minutos, para posterior centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante (900 µl) foi levado ao extrator a 45 °C, até evaporação do solvente. O resíduo foi reconstituído com 250 µl de Fase Móvel (ASTIGARRA & VANNUCHI, 2001).

3.3.5.1 Extração das amostras

O ativo NMS foi extraído do plasma através de extração líquido-líquido, com Acetato de Etila. Após evaporação do solvente, o resíduo obtido foi reconstituído com Acetonitrila : Acetato de Amônio 10 mM na proporção 70:30 e quantificado pela técnica bioanalítica CL-EM/EM.

3.3.5.2 Curva de calibração

As curvas de calibração foram obtidas através da fortificação do plasma humano e de ratas com as soluções padrões, resultando em uma faixa de concentração entre 100 e 10.000 ng/mL para humanos e 100 e 40.000 ng/mL para ratas.

3.3.5.3 Cálculo das concentrações

O cálculo de concentração das amostras (em ng/mL) é realizado pelo *Software Masslynx* através da resposta* em função da curva de calibração que utiliza o método de regressão linear, aplicando-se a ponderação $1/X^2$, gerando uma equação de reta: $y = ax + b$, onde **y** corresponde à resposta* e **x** corresponde à concentração experimental de Nimesulida; **b** corresponde à intersecção da reta no eixo y e **a** corresponde à inclinação da reta. A partir da média das concentrações obtidas de cada tempo de coleta, foi extrapolada, tanto para o medicamento teste quanto para o referência a curva da concentração plasmática.

3.3.6 Validação dos Métodos Analíticos

O método analítico foi integralmente validado para análise das amostras biológicas dos estudos em humanos. Para a análise de plasma de ratas, foi seguido exatamente o mesmo método. A reprodução foi investigada através de uma validação parcial utilizando o plasma animal, para garantir que a diferença entre a matriz biológica de humanos e ratas não fosse capaz de influenciar na qualidade e confiabilidade dos dados gerados. Os parâmetros avaliados na validação foram especificidade, precisão, exatidão, limite inferior de quantificação - LIQ, recuperação, linearidade e estabilidade. Já na validação parcial, com plasma de ratas, foram avaliados os parâmetros de precisão, linearidade e especificidade. A faixa de linearidade do método para NMS em humanos foi de 100 – 10.000 ng/mL e para ratos de 100 – 40.000 ng/mL, onde a mensuração das amostras foi controlada através de curvas de calibração e amostras de controle de qualidade. A concentração do fármaco foi obtida pela resposta cromatográfica (área do analito em relação ao padrão interno) em função da curva de calibração, calculado pelo *Software Masslynx* do Sistema do CL-EM/EM.

3.3 Análise Farmacocinética e Estatística

Para avaliação estatística dos parâmetros farmacocinéticos foi empregada análise de variância (ANOVA) sob os dados de ASC (ASC_0-t , ASC_{0-inf}) e $C_{máx}$, transformados logaritmicamente. Para isso foram utilizados os seguintes *Softwares*: *EquivTest* versão 2.0, *GraphPad Prism* versão 4.0, *WinNolin*® versão 5.3 e *Microsoft Excel* versão 2000 *Small Business*, juntamente com o programa *Microsoft Word* versão 2000 *Small Business*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Método bioanalítico

4.1.1 Validação

Para o ensaio de especificidade, foi investigada a presença de possíveis interferentes da matriz biológica com detecção no mesmo tempo de retenção do ativo NMS e do padrão interno Clortalidona. O ensaio cumpriu com a especificação de interferência máxima de 5%, pois não ocorreu interferência capaz de comprometer a quantificação dos compostos. O método de extração da mesma forma se mostrou eficiente, pois foi capaz de proporcionar a recuperação de 49,68% do ativo NMS e 51,21% do padrão interno Clortalidona. A figura 5 ilustra a detecção dos compostos NMS e Clortalidona pelo método de CL-EM/EM.

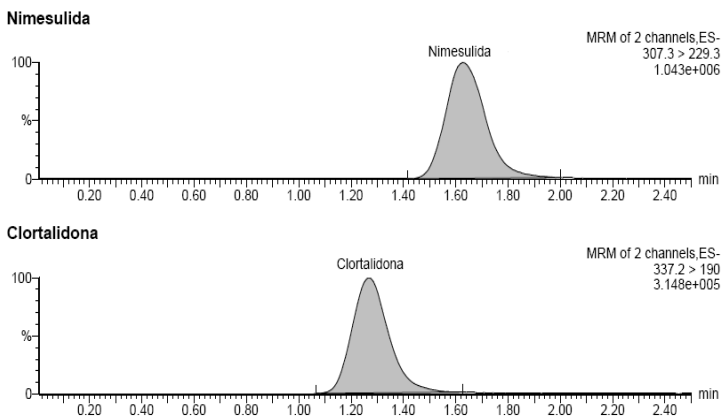


Figura 5: Cromatograma de CL-EM/EM de plasma contendo NMS e Clortalidona.

O limite de quantificação do fármaco foi de 100 ng/mL tendo-se como limite um ruído de interferência da amostra branco no tempo de retenção superior a cinco vezes o ruído da linha de base. A precisão medida pelo Coeficiente de Variação (CV%) foi de 6,10% e a exatidão de 104,45%, cujas especificações são de $\pm 20\%$ e de 80 a 120%, respectivamente. Esses dados demonstraram sensibilidade significativa

do método com precisão e exatidão, dentro dos limites preconizados. A linearidade foi determinada por oito pontos com concentrações entre 100 e 10.000 ng/mL nas curvas de calibração. A análise das curvas de concentrações em função das razões entre a área do analito e a área do padrão interno foi realizada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e revelou um coeficiente de correlação linear médio de 0,9955. A precisão e a exatidão no teste do interensaio foram determinadas através do preparo de amostras de controle de qualidade em concentrações baixa, média e alta. Os resultados das variações obtidas em todas as determinações foram de 7,26% e a variação ocorreu entre 93,20 e 106,88%. Além dos parâmetros citados, a estabilidade das amostras foi avaliada e verificou-se que não ocorreu degradação do ativo NMS durante o processamento das amostras.

Para quantificação do fármaco em plasma humano, foi desenvolvido e validado o método bioanalítico que apresentou confiabilidade nos resultados, por meio do cumprimento dos requisitos exigidos pela RE 899 de 29 de maio de 2003, que regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003a). Como especificação, o desvio em relação à concentração nominal e o coeficiente de variação devem ser menores ou iguais a 15% para todos os pontos exceto para o limite de quantificação, que poderá ser de até 20% e o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98. O limite de CV é de 15% para garantir a precisão do método e para exatidão deve-se obter concentração entre 85 a 115% do valor nominal. A reprodutibilidade do método em plasma animal foi observada pela análise de validação parcial e diante dos resultados satisfatórios obtidos considera-se o método validado, podendo ser utilizado em estudos de bioequivalência, tanto em plasma humano quanto de ratos.

4.1.2 Perfis de Dissolução de Nimesulida

Todos os lotes submetidos aos estudos de bioequivalência passam por estudos prévios de equivalência farmacêutica, onde várias análises *in vitro* são realizadas e dentre elas, destaca-se o perfil de dissolução. A figura 6 ilustra o percentual de fármaco dissolvido em função do tempo, do estudo NBE. Este ensaio de perfil de dissolução foi realizado previamente ao estudo de bioequivalência realizado no ano de 2007. Da mesma forma, a formulação submetida ao estudo de bioequivalência no ano de 2010, cujo resultado foi bioequivalente, também foi avaliada quanto ao seu perfil de dissolução, demonstrado na figura 7.

4.1.2.1 Perfil de Dissolução da formulação NBE

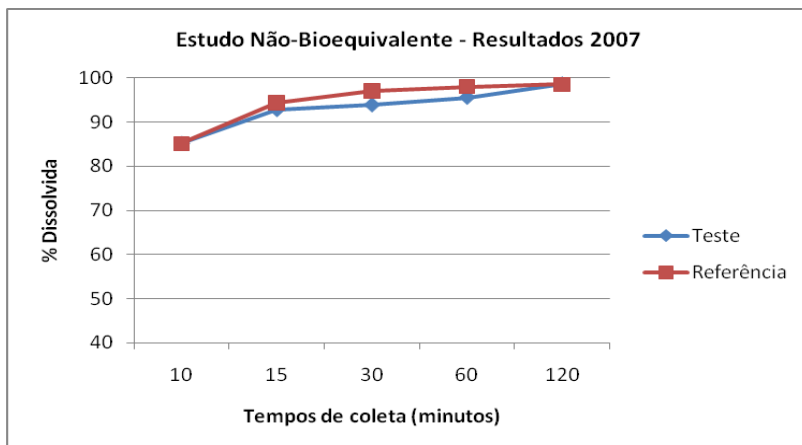


Figura 6: Perfil de Dissolução comparativo de Nisulid® (Referência) e NMS (Teste). Dados originais (estudo NBE).

4.1.2.2 Perfil de Dissolução da formulação BE

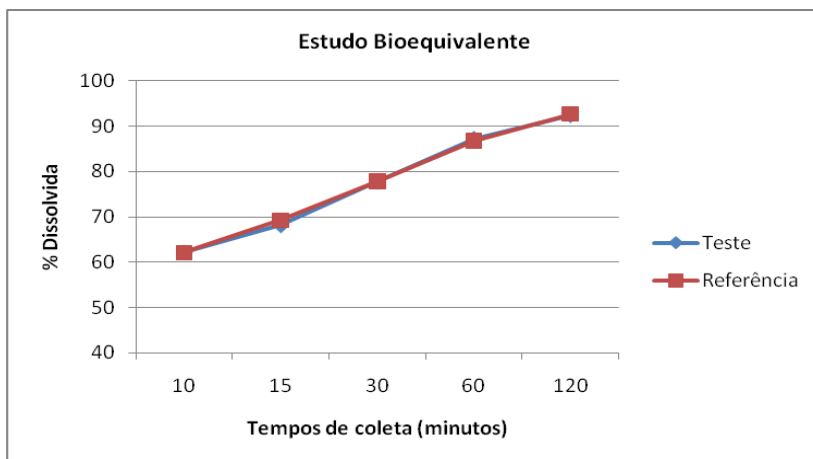


Figura 7: Perfil de Dissolução comparativo de Nisulid® (Referência) e NMS (Teste). Dados originais (estudo BE).

Como os medicamentos teste e referência pertencentes ao estudo NBE tinham data de fabricação antiga, estando com os respectivos prazos de validade próximos a expirar, foi realizado um novo perfil de dissolução comparativo destas amostras, antes de submetê-las ao experimento animal, com a finalidade de avaliar uma possível degradação do fármaco. A figura 8 ilustra o perfil de dissolução do produto NBE, re-analisado para avaliação da estabilidade da amostra, que se fez necessário para análise de viabilidade do estudo em ratas.

4.1.2.3 Perfil de Dissolução formulação NBE (análise estabilidade)

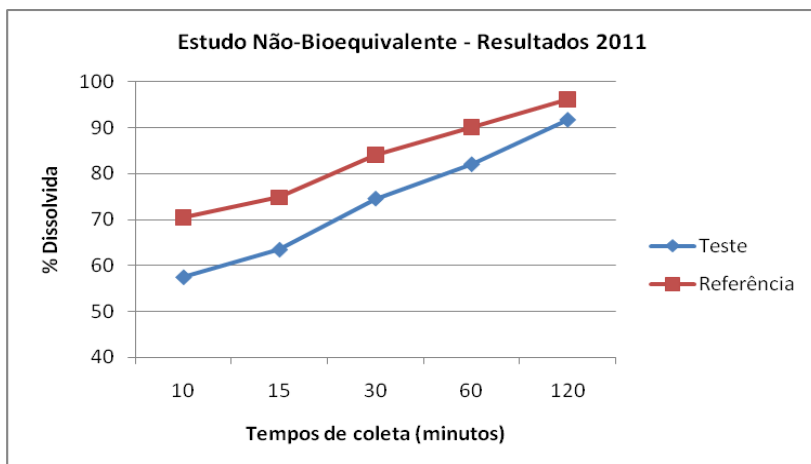


Figura 8: Perfil de Dissolução comparativo de Nisulid® (Referência) e NMS (Teste), avaliação da estabilidade (estudo NBE).

O tempo entre as análises de perfil de dissolução representadas pelas figuras 6 e 8 foi de três anos. Percebe-se que com o passar do tempo, as formulações reduziram a importante característica dos fármacos de classe II, que é a solubilidade. Mesmo visualizando que ambas as formulações continuaram apresentando alto percentual do fármaco dissolvido (superior a 90%), a solubilidade ou dissolução tornou-se mais lenta (figura 8). Essa redução gradativa na solubilidade da Nimesulida pode ser resultado de alterações polimórficas que alguns

compostos possuem de migrar para formas cristalinas mais estáveis. Geralmente essas formas apresentam menor solubilidade quando comparadas às menos estáveis.

O polimorfismo, ou diferentes formas cristalinas é uma propriedade que determinados fármacos possuem e que influenciam diretamente nas suas propriedades físico-químicas. Modificações cristalinas podem ocorrer durante os processos tecnológicos ou ainda durante o prazo de validade do produto, que podem comprometer a solubilidade/dissolução ou até mesmo alterar a biodisponibilidade do fármaco (HORTER & DRESSMAN, 1997; MARTINO et al., 2007). De acordo com critérios do FDA, é pouco provável que o polimorfismo tenha impacto sobre a biodisponibilidade de fármacos classe I e III, porém, pode ser crítico para fármacos de classe II e IV, de acordo com o SCB (KU, 2008). A Nimesulida, fármaco que apresenta diversas formas cristalinas, pode migrar de uma forma cristalina para outra, mais estável, durante o seu período de validade, reduzindo a sua solubilidade e conseqüentemente a sua biodisponibilidade (SILVA & LHA, 2010).

4.1.3 Quantificação das amostras

As coletas sanguíneas das ratas foram realizadas em 10 intervalos de tempo sucessivos, com 6 animais por ponto. Assim, foram obtidas 60 amostras de sangue de animais tratados com o medicamento teste e 60 com o medicamento referência, totalizando 120 amostras para a quantificação do fármaco Nimesulida em cada experimento (NBE e BE).

Desta quantificação foram construídas seis curvas de concentração *versus* tempo para o medicamento teste e para o medicamento referência. A partir de cada curva individual os parâmetros farmacocinéticos foram calculados (para consultar as curvas individuais ver o anexo III).

4.2 Dados dos Estudos Farmacocinéticos

4.2.1 Estudos de bioequivalência em humanos

O estudo de bioequivalência realizado em humanos com uma formulação contendo o fármaco Nimesulida (NMS) teve como objetivo comparar a biodisponibilidade relativa deste medicamento (Teste) com aquela do produto comercial Nisulid® (Referência). Para isso, foram selecionados 28 voluntários sadios (tanto para o estudo cujo resultado concluiu ser bioequivalente quanto para aquele considerado não-bioequivalente) de ambos os sexos que receberam por dois períodos distintos, ambas as formulações. Todas as amostras foram analisadas e tiveram suas respectivas concentrações do ativo NMS determinadas através da resposta cromatográfica obtida, em comparação com as curvas de calibração, pelo método CL-EM/EM.

A bioequivalência é um estudo realizado em humanos que envolve diversas etapas, como a Clínica, Analítica e Estatística. Na etapa Clínica, são recrutados voluntários sadios que passam por exames laboratoriais, consultas médicas e de enfermagem, para avaliar as condições para participação no estudo. Mediante aprovação clínica, o voluntário participa do estudo, por dois períodos, para administração dos medicamentos e coletas sanguíneas, por um período médio de 24 horas (cada período). Na etapa Analítica são analisadas as amostras coletadas, cujos resultados, tratados estatisticamente servirão para comprovar a bioequivalência entre os produtos. Todas estas etapas são previstas no Protocolo do estudo, o qual é submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa. Para execução do estudo de bioequivalência, há necessidade da submissão de seres humanos como voluntários, assim como meses de espera, até que sejam cumpridas todas as etapas e que o resultado seja repassado ao patrocinador do estudo. Concluído o estudo, caso ele seja bioequivalente, o patrocinador poderá seguir o processo de registro do produto. No entanto, caso o estudo seja reprovado, a formulação deverá retornar à etapa de desenvolvimento farmacotécnico para ajustar o produto em função do seu produto de referência e posteriormente iniciar um novo estudo de bioequivalência. No caso do primeiro estudo de Nimesulida, que não foi bioequivalente, todo custo dispensado para a sua realização, além do tempo de espera para se chegar ao resultado, poderiam ter sido investidos pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos produtos.

4.2.1.1 Formulação BE em humanos

A Figura 9 apresenta as curvas das concentrações plasmáticas da NMS e Nisulid® (medicamentos teste e referência) *versus* tempo dos 28 voluntários submetidos ao estudo de bioequivalência. A curva foi construída com as médias das concentrações obtidas de cada voluntário. Portanto, cada ponto ilustrado na figura representa a média das concentrações plasmáticas dos 28 voluntários participantes do estudo.

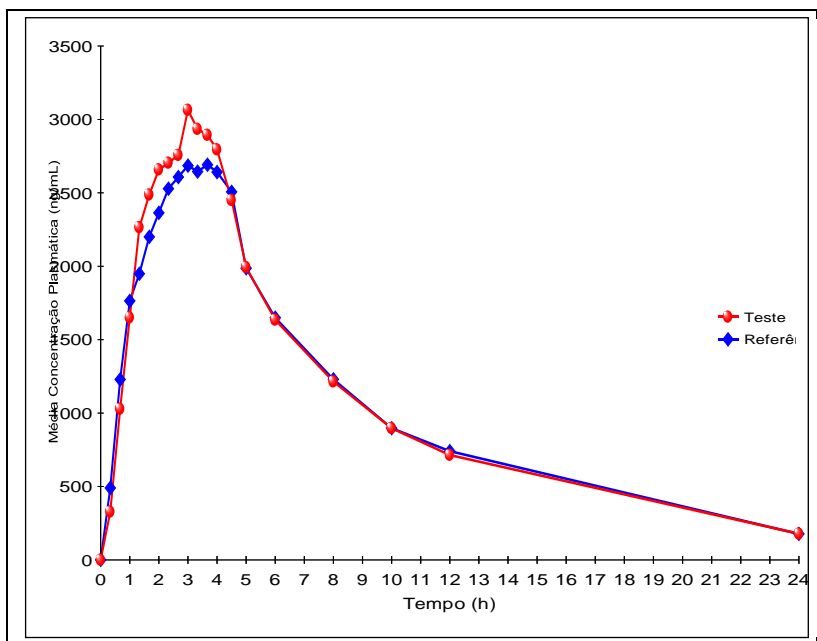


Figura 9: Curva das concentrações plasmáticas médias de Nisulid® (Referência) e NMS (Teste) em humanos (estudo BE).

A partir dos dados de quantificação do fármaco, foram calculados os parâmetros farmacocinéticos que apresentamos na tabela 4. Destes dados apresentados, somente os parâmetros de $C_{m\acute{a}x}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} , foram utilizados para comparação entre as formulações, para comprovação da bioequivalência.

Tabela 4: Dados Farmacocinéticos obtidos em Humanos (BE)

Parâmetro	Medicamento	Medicamento
Farmacocinético	Teste	Referência
$t_{1/2}$	4,48	4,62
T_{\max}	2,41	2,75
C_{\max}	3615,09	3168,11
ASC_{0-t}	23525,78	23364,80
ASC_{0-inf}	26927,63	26547,70

Para que dois produtos sejam considerados bioequivalentes, a razão das médias das formulações deve estar entre 80 e 125%, considerando um intervalo de confiança de 90%. A tabela 5 apresenta os resultados dos parâmetros farmacocinéticos transformados em logaritmo natural, cujos resultados estão incluídos dentro do intervalo de 80 a 125%, de acordo com a legislação vigente, e por este motivo, os produtos foram considerados bioequivalentes.

Tabela 5: Intervalos de Confiança Paramétricos para a Razão das Médias das Formulações Teste e Referência (BE)

Razão T/R	Média Geométrica	Intervalo de Confiança (90%)	Intervalo de Bioequivalência	Poder do Teste	Conclusão
Ln (C_{máx})	114,17	(108,24% - 120,42%)	(80,00% - 125,00%)	99,99%	Bioequivalente
Ln (ASC_{0-t})	100,41	(93,74% - 107,56%)	(80,00% - 125,00%)	99,99%	Bioequivalente
Ln (ASC_{0-inf})	100,61	(94,11% - 107,57%)	(80,00% - 125,00%)	99,99%	Bioequivalente

4.2.2.2 Formulação NBE em humanos

A Figura 10 apresenta as curvas das concentrações plasmáticas médias do NMS e Nisulid[®] (medicamentos Teste e Referência) *versus* tempo dos 28 voluntários submetidos ao estudo de bioequivalência.

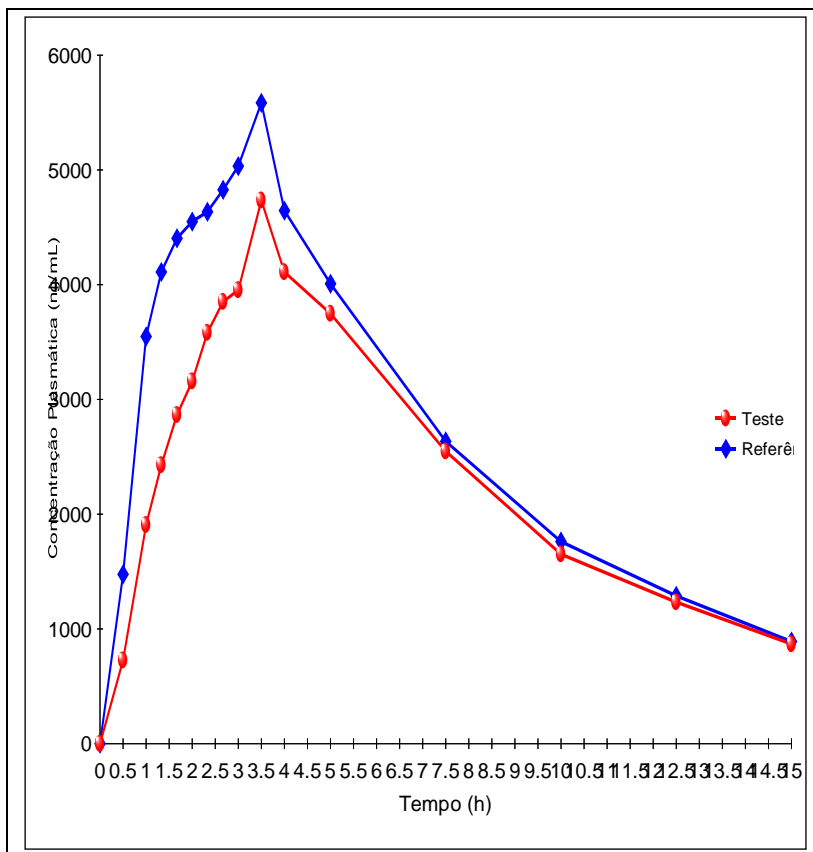


Figura 10: Curva das concentrações plasmáticas médias de Nisulid® (Referência) NMS (Teste) em humanos (estudo NBE).

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados a partir dos dados da quantificação são apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros Farmacocinéticos obtidos em Humanos (estudo NBE)

Parâmetro	Medicamento	Medicamento
Farmacocinético	Teste	Referência
$t_{1/2}$	4,76	4,47
T_{max}	3,26	3,48
C_{max}	5005,78	6508,70
ASC_{0-t}	34762,94	40388,20
ASC_{0-inf}	45418,15	50336,16

Na tabela 7 são mostrados os valores dos intervalos de confiança (IC 90%) para C_{max} , ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} . Como se pode observar, onde constam os resultados obtidos no primeiro estudo de bioequivalência realizado para o fármaco NMS (2007), o parâmetro de C_{max} determinou a reprovação do estudo uma vez que os intervalos de confiança de 90% para as razões das médias da formulação teste/formulação referência se encontram fora do intervalo de bioequivalência de 80 e 125% (71,93 – 80,66%).

Tabela 7: Intervalos de Confiança Paramétricos para a Razão das Médias das Formulações Teste e Referência (NBE)

Razão T/R	Média Geométrica	Intervalo de Confiança (90%)	Intervalo de Bioequivalência	Poder do Teste	Conclusão
Ln (C _{máx})	76,17	(71,93% - 80,66%)	(80,00%- 125,00%)	99,99%	Não-Bioequivalente
Ln (ASC _{0- ∞})	86,10	(80,84% - 91,71%)	(80,00%- 125,00%)	99,99%	Bioequivalente
Ln (ASC _{0- inf})	87,97	(80,01% - 96,72%)	(80,00%- 125,00%)	98,55%	Bioequivalente

4.2.2 Estudo de Bioequivalência em animais

O objetivo da determinação dos parâmetros farmacocinéticos da biodisponibilidade da NMS em animais foi o de avaliar se estes parâmetros poderiam ser preditivos da biodisponibilidade de formulações contendo este fármaco em seres humanos. Para isso, foram utilizadas 24 ratas saudáveis em cada experimento, subdivididas em grupos de 6 animais ($n = 6$ curvas/grupo) que receberam em um único período, uma das formulações. Todas as amostras foram igualmente analisadas e tiveram suas respectivas concentrações do ativo NMS determinadas através da resposta cromatográfica obtida, em comparação com as curvas de calibração.

4.2.2.1 Formulação BE em humanos

A Figura 11 apresenta as curvas das concentrações plasmáticas da NMS e Nisulid® (medicamentos teste e referência) *versus* tempo obtidas com 12 ratas (6 curvas) de cada formulação, no estudo de

bioequivalência. Da mesma forma que o estudo em humanos, a figura representa a média das concentrações obtidas no grupo de ratas.

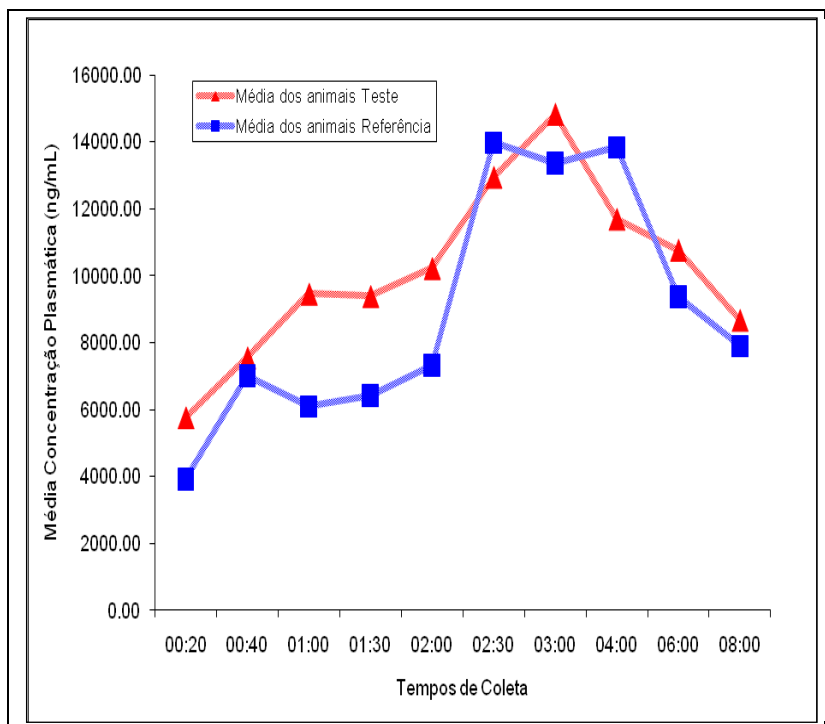


Figura 11: Curva das concentrações plasmáticas de Nisulid® e NMS em ratas (estudo BE).

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados, a partir dos dados da quantificação e apresentam-se na tabela 8. Os resultados individuais estão disponíveis para consulta, no anexo II.

Tabela 8: Parâmetros Farmacocinéticos obtidos em Ratas (Estudo BE).

Parâmetro	Medicamento		Medicamento	
Farmacocinético	Teste	CV(%)	Referência	CV(%)
$t_{1/2}$	8,8818	58,91	5,4540	40,79
$T_{\text{máx}}$	3,50	38,33	3,25	25,28
$C_{\text{máx}}$	18019,35	18,13	14919,18	15,80
ASC_{0-t}	97387,07	6,62	77455,69	18,04
ASC_{0-inf}	225248,09	31,00	139400,80	19,68

Na tabela 9 são mostrados os valores dos intervalos de confiança (IC 90%) para $C_{\text{máx}}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} . O resultado do estudo em ratas não foi bioequivalente, pois a razão das médias dos parâmetros farmacocinéticos dos medicamentos teste e referência, não estão incluídos no intervalo de 80 e 125%.

Tabela 9: Intervalos de Confiança Paramétricos para a Razão das Médias das Formulações Teste e Referência (estudo BE).

Razão T/R	Média Geométrica	Intervalo de Confiança (90%)	Intervalo de Bioequivalência	Poder do Teste	Conclusão
Ln (C_{máx})	83,08	(70.53% - 97.87%)	(80,00%- 125,00%)	73,78%	Não Bioequivalente
Ln (ASC₀)	78.71	(68.90% - 89.91%)	(80,00%- 125,00%)	87,65%	Não Bioequivalente
Ln (ASC₀ inf)	62.91	(49.33% - 80.22%)	(80,00%- 125,00%)	44,52%	Não Bioequivalente

Em humanos, os valores obtidos de $C_{máx}$ no estudo NBE foi de 5005,78 e 6508,70 ng/mL e no estudo BE, 3615,09 e 3168,11 ng/mL para os medicamentos T e R, respectivamente. Em ratas os valores encontrados foram 18019,35 (T) e 14919,18 ng/mL (R), obtidos com a administração do produto BE para humanos. Observa-se que em humanos a formulação T apresentou uma maior concentração em relação ao medicamento de referência e nos ratas a relação foi na mesma direção, ou seja, o $C_{máx}$ para o T foi mais elevado, demonstrando uma tendência semelhante para este parâmetro. Nota-se que a concentração plasmática obtida em animais foi cerca de cinco vezes maior do que aquela observada em humanos, possivelmente consequência do uso de dose proporcionalmente mais elevada para os animais em relação aquelas usadas nos humanos. Evidentemente, que não se pode descartar outros fatores como a solubilização do comprimido para a administração aos ratos, processo que pode aumentar a biodisponibilidade do produto,

quando comparada à administração do medicamento na sua forma intacta.

4.2.2.2 Formulação NBE em humanos

A Figura 12 apresenta as curvas das concentrações plasmáticas médias da NMS e Nisulid® (medicamentos teste e referência) *versus* tempo obtidas com 12 ratas (cada formulação) no estudo de bioequivalência.

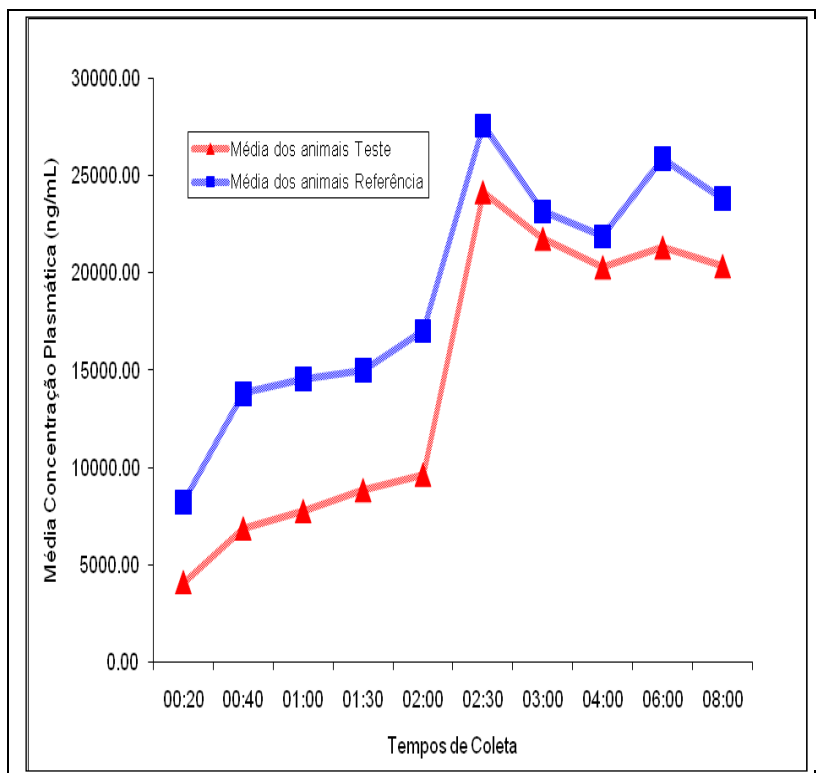


Figura 12: Curva das concentrações plasmáticas médias de Nisulid® e NMS em ratas (estudo NBE).

Não foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos deste experimento. No anexo III estão disponíveis as curvas de concentração plasmática *versus* tempo, individuais das ratas, onde podemos observar que o processo de eliminação não foi iniciado e com isso, o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos pode trazer resultados duvidosos.

O resultado do primeiro estudo em humanos não foi bioequivalente (NBE), porém, no segundo estudo, após a realização de adequações farmacotécnicas, as formulações foram bioequivalentes (BE). Já a avaliação de bioequivalência em animais, dos mesmos produtos, foi não-bioequivalente em ambos os casos. Em ratas foram obtidas concentrações plasmáticas em função do tempo que puderam caracterizar as fases de absorção e de eliminação. Porém, na avaliação do produto NBE, pode-se observar uma diferença nítida na fase de eliminação do fármaco, quando os resultados desta fase são comparados com o produto BE. Essa diferença na eliminação da NMS entre os estudos foi observada tanto em humanos quanto em ratos. Com os mesmos tempos de coleta, foi possível visualizar parte da eliminação do estudo BE, o que não se repetiu no estudo NBE. Possivelmente a eliminação mais lenta do estudo NBE tenha ocorrido em função da maior concentração sanguínea resultado da característica de dissolução da formulação.

Quando se observa a curva de concentração plasmática do estudo NBE, tanto em humanos, quanto em ratas, percebe-se que a absorção do medicamento Teste foi mais lenta que a do Referência e sob uma extensão menor, da mesma forma. Esses dados demonstram a capacidade do modelo animal em predizer o comportamento do produto *in vivo*, quanto ao parâmetro $C_{máx}$.

A dose administrada para as ratas foi estimada a partir de cálculos alométricos cujo princípio é utilizar uma escala de parâmetros fisiológicos e farmacocinéticos, comparando animais de vários tamanhos, com o objetivo de correlacioná-los. A absorção, distribuição e eliminação de muitas drogas administradas ao animal envolvem processos fisiológicos, compatíveis com a escala alométrica (LIPSCOMB, 2008; MAHMOOD, 2007). De acordo com os cálculos realizados, 100 mg de Nimesulida administrados a um indivíduo de aproximadamente 70 kg, equivale a dose de 5,58 mg/kg de peso em ratos (ZUIDEVELD & GRAAF, 2007). Esta dose é semelhante àquela empregada por FERRARIO & BIANCHI (2003) que administraram pela mesma via (oral) em ratos, a dose de 5,0 mg/kg de NMS.

Para o parâmetro de $T_{\text{máx}}$ (tempo onde ocorreu o $C_{\text{máx}}$), os valores obtidos em ratas, foram de 3,50 horas para T e 3,25 horas para R. Em humanos os valores encontrados para o $T_{\text{máx}}$ foram 2,41 horas para o Teste e 2,75 para o Referência, para o estudo BE e de 3,26 horas e 3,48 horas para T e R no estudo NBE. Apesar deste não ser um parâmetro capaz de reprovar um estudo de bioequivalência, é de extrema relevância avaliá-lo, pois ele é capaz de nos fornecer informações sobre a velocidade de absorção. O tempo necessário para atingir a concentração máxima do fármaco foi de aproximadamente uma hora a mais em ratas, do que a visualizada em humanos, demonstrando uma absorção mais lenta em animais. A velocidade de absorção do fármaco foi mais lenta nos animais do que em humanos, mesmo considerando que as ratas receberam o fármaco através de uma solução feita com o comprimido desintegrado e diluído em água, enquanto que a administração do comprimido intacto, com 200 mL de água, foi feita a humanos. A desintegração da forma farmacêutica para realizar a diluição do comprimido antes da administração aos animais poderia aumentar a velocidade de absorção do fármaco. No entanto, os valores de $T_{\text{máx}}$ foram próximos aos indicados para o medicamento de referência, ou seja, entre 2 e 3 horas (SILVA, 2006).

Para o parâmetro de $t_{1/2}$, ou meia-vida de eliminação do fármaco, foram obtidos os valores de 8,88 horas para T e 5,45 horas para R, em ratas. Em humanos estes valores foram menores, com tempos de 4,48 horas para T e 4,62 horas para R no estudo BE e de 4,76 e 4,47 horas para T e R, no estudo NBE. Estes dados indicam que a eliminação da NMS em ratos foi mais lenta do que em humanos, porém estes valores são desiguais entre os tratamentos T e R.

Em humanos, para o parâmetro área sob a curva, no estudo BE os valores obtidos de ASC_{0-t} foram de 23525,78 (T) e 23364,80 (R) e para $ASC_{0-\text{inf}}$, 26927,63 (T) e 26547,70 (R). Para o NBE, 34762,94 (T) e 40388,20 (R) e 45418,15 (T) e 50336,16 (R), respectivamente (tabelas 4 e 6). No estudo BE, é possível visualizar a proximidade dos resultados de T e R, indicando uma extensão da absorção muito semelhante entre os produtos. Essa característica não foi observada no estudo NBE, onde o medicamento T apresentou uma absorção com menor extensão. Ressalta-se que este parâmetro não foi reprovado no estudo NBE, porém, os percentuais encontrados no intervalo de confiança foram muito próximos do limite inferior exigido. Portanto, necessitaria de uma diferença menor que 1%, para que todos os parâmetros fossem reprovados no estudo em humanos. Em ratos, os valores encontrados foram de 97387,07 (T) e 77455,69 (R) para ASC_{0-t} e de 225248,09 (T) e

139400,80 (R) para ASC_{0-inf} (tabela 8). Acredita-se que os tempos de coleta no experimento em ratos foram insuficientes para estabelecer um perfil mais completo de eliminação do fármaco. E conseqüentemente podem ter influenciado diretamente na estimativa do parâmetro ASC. Uma análise visual no perfil das curvas de concentração plasmática *versus* tempo evidencia diferenças entre T e R já na fase de absorção de ambos os estudos, o que resultou em diferenças nas ASCs.

Os dados farmacocinéticos nos permitem observar que tanto os medicamentos T quanto os de R, apresentaram diferenças entre os dois estudos em humanos. Essas diferenças podem ser provenientes da variabilidade relacionada ao fármaco (solubilidade da NMS), da formulação, lotes diferentes, que foram fabricados com uma diferença aproximada de 3 anos, ou principalmente da variabilidade entre os indivíduos.

Outros aspectos a ser considerado são a variabilidade entre as espécies empregadas, a diferença no número de sujeitos experimentais e o desenho experimental. Como exemplo, podemos lembrar que os voluntários foram em número de 28, participando em ensaio cruzado, onde cada um recebeu tanto a formulação T num período quanto a formulação R noutro. Neste caso cada voluntário é o controle de si próprio. Além disso, de um mesmo voluntário foram coletadas todas as amostras nos diversos intervalos de tempo “ t_0 ” ao tempo “ t_n ”, enquanto que cada rata só forneceu 5 tempos de coleta, utilizando-se 4 animais para cada curva (2 para T e 2 para R) de concentração e assim mesmo insuficientes para permitir um delineamento mais completo da fase de eliminação. Nos animais a administração das formulações T e R foram realizadas a diferentes animais, e em número muito reduzido (6 curvas).

Uma importante observação deve ser feita em relação a todos os estudos avaliados neste trabalho, a respeito do parâmetro $C_{m\acute{a}x}$. A quantidade de NMS encontrada em plasma humano no estudo NBE, foi de aproximadamente o dobro da concentração encontrada no estudo BE. Concentrações próximas às obtidas no estudo BE, 3.000 ng/mL, foram encontradas em estudo de bioequivalência de NMS em plasma humano, realizados em outros centros de pesquisa (YANG & FANG, 2010), sendo esta a concentração esperada conforme bula do próprio medicamento referência. PTACEK et al. (2001) encontrou ainda um $C_{m\acute{a}x}$ próximo a 4.000 ng/mL, reforçando a concentração esperada deste fármaco na corrente sanguínea. Quando se observa os resultados em ratas, os dados revelam que o estudo NBE atingiu duas vezes a concentração plasmática obtida no estudo BE, confirmando a diferente absorção das formulações ocorrida em humanos. Neste aspecto, é de

suma importância discutir a diferença encontrada nas concentrações plasmáticas de NMS, tanto em humanos quanto em ratas, entre os estudos BE e NBE. Na fase de desenvolvimento de um produto são realizados ensaios *in vitro*, como perfil de dissolução, que auxiliam no desenvolvimento da formulação e cujos ajustes farmacotécnicos, permitem chegar a uma formulação onde se acredita que terá um comportamento *in vivo* semelhante ao medicamento de R. Ressalta-se que a velocidade e extensão da absorção de um medicamento são características de fundamental importância, para que o produto apresente eficácia terapêutica, durante todo intervalo posológico a que se propõe e para que não apresente efeitos tóxicos, comprometendo sua segurança. A grande variabilidade no comportamento desta classe de medicamentos (R), quando existente, compreende a principal dificuldade no desenvolvimento de medicamentos genéricos. Esta variabilidade pode ser resultado de pequenas alterações, tanto no produto farmacêutico, quanto no processo produtivo deste, que por muitas vezes são imperceptíveis aos consumidores e aos centros de pesquisa, que podem produzir significativas alterações na sua biodisponibilidade e consequentemente, na sua eficácia terapêutica. Ciente deste problema a ANVISA publicou no ano de 2009 a Resolução Nº 48 de 6 de outubro de 2009, que trata das possibilidades de alterações pós-registro (alterações, inclusões, suspensões, reativações e cancelamentos) e das respectivas obrigações das indústrias farmacêuticas para concessão da mudança (BRASIL, 2009). Dentre as comprovações a serem apresentadas pelas indústrias, de acordo com a resolução, encontram-se desde perfis de dissolução a estudos de bioequivalência, visando comprovar que possíveis alterações no produto, não venham a comprometer o desempenho *in vivo* do mesmo.

O perfil de dissolução *in vitro* não foi capaz de prever o possível comportamento do fármaco no organismo, em especial a diferença de $C_{máx}$ obtida entre os estudos em humanos. Pela dificuldade de se estimar parâmetros como $C_{máx}$ e ASC baseando-se somente em dados coletados *in vitro*, considera-se o método *in vivo* (animais) a ferramenta mais adequada para elucidar o real comportamento *in vivo* do produto farmacêutico. Especialmente para fármacos de classe II, o perfil de dissolução tem de ser desenvolvido com meios e método discriminativos, capazes de alertar sobre diferenças entre T e R e assim, ser bio-relevantes (JANTRATID et al., 2009; SOUZA, 2007). Como a etapa limitante da absorção desta classe é a solubilidade, todas as alternativas devem ser avaliadas para maior segurança no estudo de bioequivalência (SOUZA, 2007; HORTER & DRESSMAN, 1997).

Como limitação do modelo animal para o insucesso de prever a bioequivalência em humanos pode referir o pequeno número de animais empregados, enquanto para os estudos em humanos recomenda-se a utilização de no mínimo 24 voluntários. Este é um fator crítico nestes estudos devido à variabilidade individual dos dados. A utilização de animais diferentes para comporem os grupos T e R, contribuiu ainda mais para a variabilidade aos dados individuais. Ainda mais importante, acrescenta-se que o tempo de coleta das amostras dos animais foi mais curto que o período de coleta nos humanos o que acabou comprometendo a aquisição dos dados para compor a fase de eliminação do fármaco nos animais.

O protocolo experimental proposto para avaliação preditiva de formulações de Nimesulida em ratas não foi adequado para chegar a resultados comparáveis àqueles obtidos em humanos. Porém, pesquisa não se resume a números e é nítida a importância dos resultados obtidos através do experimento em ratas. A possibilidade de avaliar a absorção e eliminação de medicamentos, apesar da diferença existente entre as espécies e de seus respectivos desenhos experimentais, estimulam a nós pesquisadores a aprimorar esta ferramenta para auxiliar no desenvolvimento de medicamentos de alta qualidade e consequentemente na promoção da saúde e bem-estar da população.

5 CONCLUSÕES

- ➔ O método analítico utilizado para a quantificação das amostras sanguíneas do experimento foi adequado, pois cumpriu com todos os requisitos de validação, garantindo a confiabilidade nas determinações das concentrações plasmática de NMS;
- ➔ Os parâmetros farmacocinéticos de bioequivalência ($C_{\text{máx}}$ e ASC) diferiram significativamente entre as formulações teste e referência e, portanto não atingiram os critérios para que fossem consideradas bioequivalentes.
- ➔ O protocolo experimental de bioequivalência não foi capaz de reproduzir os resultados dos estudos de bioequivalência encontrados em seres humanos para as formulações contendo Nimesulida.

6 REFERÊNCIAS

AMIDON, G. L., LENNERNAS, H., SHAH, V. P., CRISON, J. R. **A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in vitro* Drug Product Dissolution and *in vivo* Bioavailability.** Pharmaceutical Research, Vol 12, N. 3, 1995.

ASTIGARRA, R. E. B., VANNUCHI Y. B. et al. **Quantification of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence studies.** Journal of Mass Spectrometry, 36 (2001) 1281–1286.

BERNAREGGI, A. **Clinical pharmacokinetics and metabolism of nimesulide.** *Inammopharmacology*, Vol. 9, No. 1, 2, pp. 81–89 (2001).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei 9.787 de 10 de fevereiro de 1999. **Estabelece o medicamento genérico e dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos.** Diário Oficial da União, Brasília, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 478 de 19 de março de 2002. **Determina a publicação do "Guia para Provas de Bioequivalência de Medicamentos Genéricos".** Diário Oficial da União, Brasília, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 899 de 29 de maio de 2003. **Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos".** Diário Oficial da União, Brasília, 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 898 de 29 de maio de 2003. **“Determina a publicação do "Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de**

biodisponibilidade relativa/bioequivalência". Diário Oficial da União, Brasília, 2003b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência, 2002.** Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 10 de novembro de 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 1170, de 19 de abril de 2006. **“Determina a publicação do Guia Para Provas de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência de Medicamentos”.** Diário Oficial da União, Brasília, 24 de abril de 2006.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE 16, de 2 de março de 2007. Aprova o Regulamento técnico para medicamento genérico.** Diário Oficial da União, Brasília, 2007.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 48, de 6 de outubro de 2009. Dispõe sobre realização de alteração, inclusão, suspensão, reativação e cancelamento Pós-Registro de medicamentos.** Diário Oficial da União, Brasília, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 31 de 11 de agosto de 2010. **Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo.** Diário Oficial da União, Brasília, 12 de agosto de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de Estatística de Medicamentos Genéricos.** Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em março de 2011.

CALIXTO, J.B., SIQUEIRA JR, J.M. **Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios.** Gazeta Médica da Bahia, 78 (Suplemento 1): 98-106, 2008.

EMAMI, J. **In vitro - In vivo Correlation: From Theory to Applications.** J Pharm Pharmaceut Sci (www.cspscanada.org) 9 (2): 31-51, 2006.

FERRARIO, P.; BIANCHI, M. **Simultaneous determination of nimesulide and hydroxynimesulide in rat plasma, cerebrospinal fluid and brain by liquid chromatography using solid-phase extraction.** Journal of Chromatography B, 785 (2003) 227–236.

FLACH, A. O. P., DALLA COSTA, T. **Avaliação dos critérios de isenção de estudos de bioequivalência *in vivo* para medicamentos orais em forma farmacêutica sólida de liberação imediata.** Caderno de Farmácia, v. 15, n. 2, p. 49-58, 1999.

GHAZAL, H. S., DYAS, A. M., FORD, J. L., HUTCHEON, G. A. ***In vitro* evaluation of the dissolution behaviour of itraconazole in bio-relevant media.** International Journal of Pharmaceutics 366 (2009) 117–123.

GILROY, D. W.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D. A. **Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase _ cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2/ in acute inflammation.** European Journal of Pharmacology 355 _1998. 211–217.

GOODMAN, A. G.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 11 ed. Editora McGraw-Hill, 2006.

HORTER, D.; DRESSMAN, J. B. **Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract.** Advanced Drug Delivery Reviews 25 (1997) 3-14.

JANTRATID, E.; MAIO, V. D.; RONDA, E.; MATTAVELLI, V.; VERTZONI, M.; DRESSMAN, J. B. **Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of *in vivo* performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form.** European Journal of Pharmaceutical Sciences 37 (2009) 434–441.

KAPSI, S. G., AYRES, J.W. **Processing factors in development of solid solution formulation of itraconazole for enhancement of drug dissolution and bioavailability.** International Journal of Pharmaceutics 229 (2001) 193–203.

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia Básica & Clínica.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

KU, M. S. **Use of the Biopharmaceutical Classification System in Early Drug Development.** The AAPS Journal, Vol. 10, No. 1, March 2008.

KURUMBAIL, R. G.; KIEFER, J. R.; MARNETT, L. **Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition.** *Current Opinion in Structural Biology* 2001, 11:752–760.

LENNERNAS, H., ABRAHAMSSON, B. **The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2005, 57: 273–285.

LENNERNAS, H. **Animal data: The contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery *in vivo*.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 1103–1120.

LIPSCOMB, J.C.; POET, T. S. **In vitro measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling.** *Pharmacology & Therapeutics* 118 (2008) 82–103.

LOBENBERG, R., AMIDON, G.L. **Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 3–12.

MAHMOOD, I. **Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 1177–1192.

MARTINO, P. D., CENSI, R., BARTHELEMY, C., GOBETTO, R., JOIRIS, E., MASIC, A., ODOU, P., MARTELLI, S. **Characterization and compaction behavior of Nimesulide crystal forms.** *International Journal of Pharmaceutics* 342 (2007) 137–144.

MELLAERTS, R.; MOLS, R.; JAMMAER, J. A. G.; AERTS, C. A.; ANNAERT, P.; HUMBEECK, J. V.; MOOTER, G. V. D.; AUGUSTIJNS, P.; MARTENS, J. A.

Increasing the oral bioavailability of the poorly water soluble drug itraconazole with ordered mesoporous silica. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 69 (2008) 223–230.

MILANI, P. Z., JALALI, M. B., AZIMI, M., VALIZADEH, H. **Biopharmaceutical Classification of drugs using intrinsic dissolution rate and rat intestinal permeability.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 73 (2009) 102–106.

MOFFAT, A. C., OSSELTON, D. M., WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons.** Editora E G C Clarke, Third edition, 2004.

MONEGHINI, M.; ZINGONE, G.; ZORDI, N. D. **Influence of the microwave technology on the physical–chemical properties of solid dispersion with Nimesulide.** Powder Technology 195 (2009) 259–263.

NATION, R.L., SANSOM, L.N. **Bioequivalence requirements for Generic Products.** Pharmac. Ther. Vol 62, pp 41-55, 1994.

NISULID: **Nimesulida.** Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Guarulhos, SP.

PANCHAGNULA, R., THOMAS, N. S. **Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research.** International Journal of Pharmaceutics 201/ 131–150, 2000.

PTÁČEK, P., MACEK, J., KLÍMA, J. **Rapid and simple high-performance liquid chromatographic determination of nimesulide in human plasma.** Journal of Chromatography B, 758 (2001) 183–188.

SHOUKRI, R. A.; AHMED, I. S.; SHAMMA, R. N. **In vitro and in vivo evaluation of nimesulide lyophilized orally disintegrating tablets.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 73 (2009) 162–171.

SILVA, P. **Farmacologia.** 7 ed. Editora Guanabara Koogan S.A. 2006.

SILVA, F. C.; PRESGRAVE, O. A. F. **Manual de Utilização de Animais /Fiocruz.** 1 ed. Rio de Janeiro. 2008.

SILVA, G. D.; LHA, K. **Polimorfismo: caracterização e estudo das propriedades de uma fase cristalina.** Journal of Aerospace Technology and Management. São José dos Campos, Vol. 2, No. 3, pp. 331-338, 2010.

SOUZA, J. D.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS. **Modelos in vitro para determinação de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 43, n. 4, out./dez., 2007.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F. S.; VILANOVA, C. M. **A Equivalência Farmacêutica no contexto da Intercambialidade entre Medicamentos Genéricos e de Referência: Bases Técnicas e Científicas.** São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2004.

WALL, R.J, SHANI, M. Are **animal models as good as we think?** Theriogenology 69/ 2–9, 2008.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for the who model list of essential medicines immediate release, solid oral dosage forms.** Working document QAS/04.109/Rev.1, 2005.

WU, C. Y.; BENET, L.Z. **Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System.** *Pharmaceutical Research*, Vol. 22, No. 1, 2005.

YANG, W. W., FANG, L. N. *et al.* **A simple and robust HPLCMS method for the quantitative determination of nimesulide in human plasma and its application to bioequivalence study in Chinese volunteers.** Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 19 (2010) 379–386.

ZUIDEVELD, K. P.; GRAAF, P. H. V.; *et al.* **Allometric Scaling of Pharmacodynamic Responses: Application to 5-Ht1A Receptor Mediated Responses from Rat to Man.** *Pharmaceutical Research*, 2007.

ANEXOS

Anexo I Aprovação do Comitê de Ética

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00426

Título

Proposição de um modelo animal em ratos para avaliação de biodisponibilidade de medicamentos.

Data de Entrada

03/08/2010

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

03/09/2010

Considerações

Ofício nº 173/CEUA/PRPE/2010

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Anicleto Poli, Departamento de Farmacologia – CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois ano(s), para a utilização de cento e vinte ratos (*Rattus Norvegicus*).

A CEUA acrescenta que o alojamento dos animais deverá ser em gaiolas com tamanho de 42x34x16cm com até 5 ratos na faixa de peso proposta.

- Procedência do animal: Biotério da UNIPAR.

- Processo cadastrado sob o número:

23080.027314/2010-92

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 15/12/2012

Data 15/09/2010

Parecer(es):



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**

Anexo II
Parâmetros Farmacocinéticos em Ratas (valores individuais)

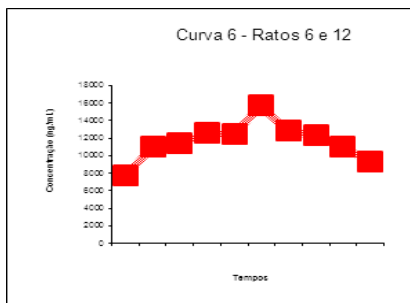
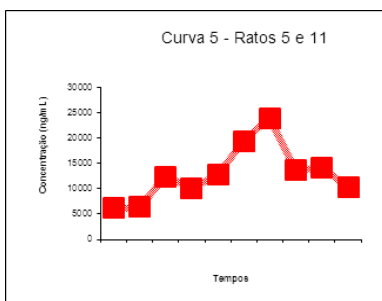
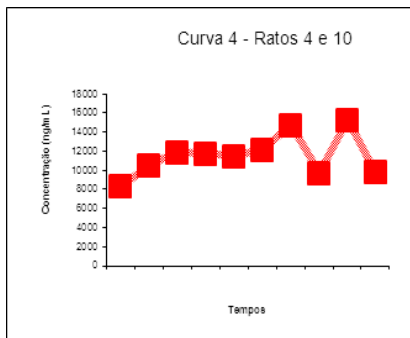
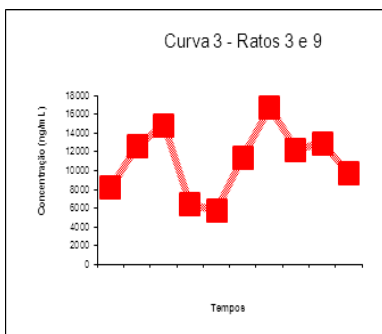
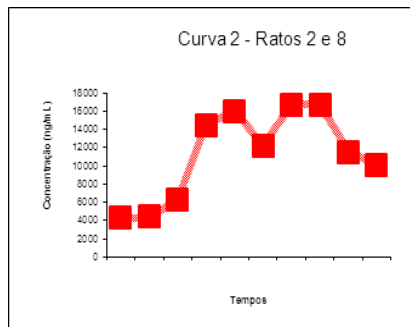
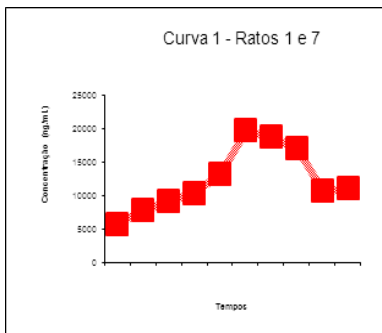
Dados Farmacocinéticos Medicamento **TESTE (BE)**

Animal	T_{1/2}	T_{max}	C_{max}	ASC_{0-t}	ASC_{0-inf}
1	5.7823	2.50	19821.37	102856.71	196587.85
2	5.5732	4.00	16701.93	97454.86	179110.26
3	7.9225	3.00	16773.83	91271.60	202792.38
4	18.8658	6.00	15255.05	94851.87	363512.71
5	5.0941	3.00	23840.95	106974.67	182776.91
6	10.0528	2.50	15722.99	90912.70	226708.42
Média	8.8818	3.50	18019.35	97387.07	225248.09
CV%	58.91%	38.33%	18.13%	6.62%	31.00%

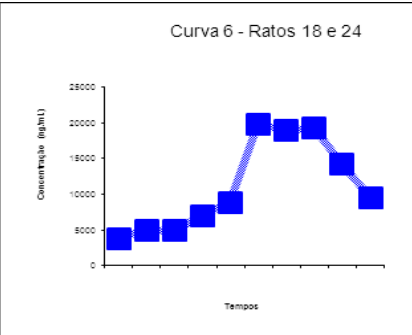
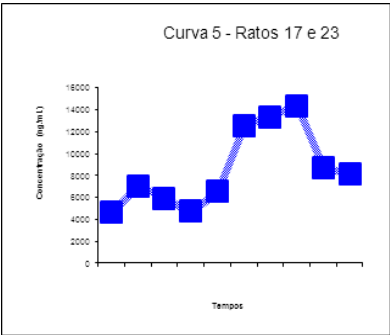
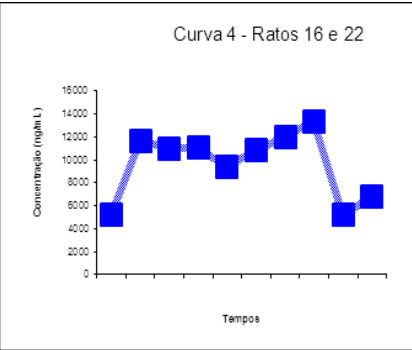
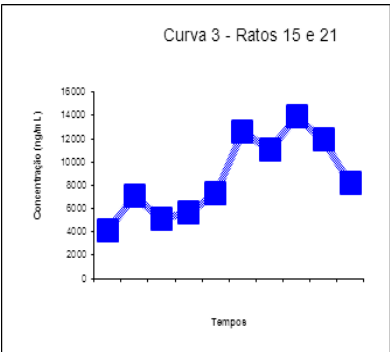
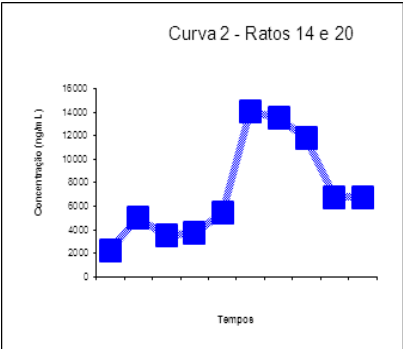
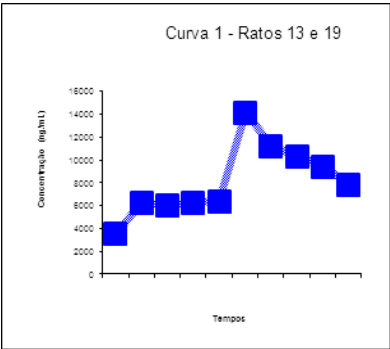
Dados Farmacocinéticos Medicamento **REFERÊNCIA (BE)**

Animal	T_{1/2}	T_{max}	C_{max}	ASC_{0-t}	ASC_{0-inf}
7	9.8868	2.50	14122.34	69608.55	180858.60
8	4.5670	2.50	14047.14	63756.77	108520.69
9	5.2887	4.00	13913.60	79967.82	142814.70
10	4.1506	4.00	13366.60	72212.97	113252.06
11	4.8773	4.00	14384.87	75479.34	132807.92
12	3.9538	2.50	19680.52	103708.67	158150.85
Média	5.4540	3.25	14919.18	77455.69	139400.80
CV%	40.79%	25.28%	15.80%	18.04%	19.68%

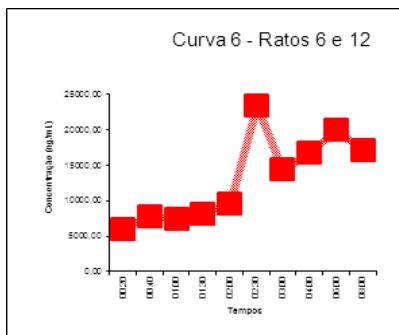
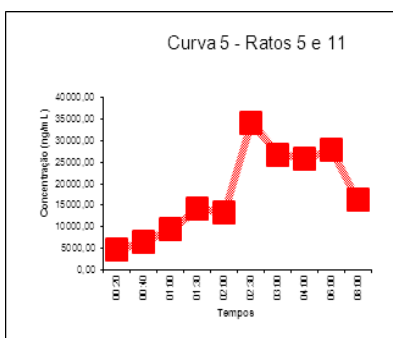
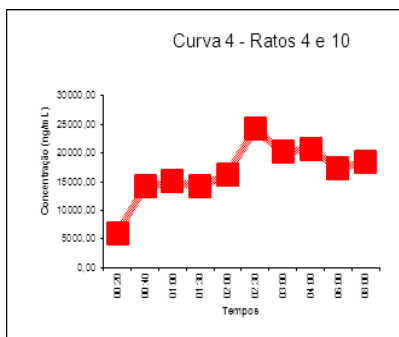
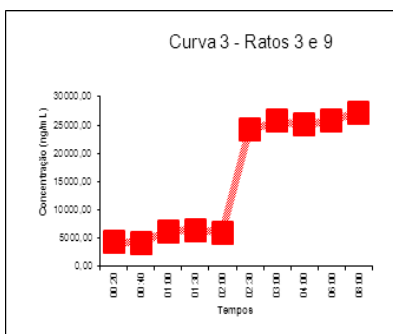
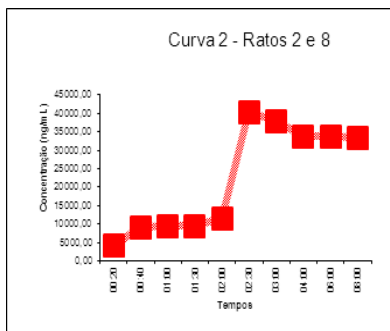
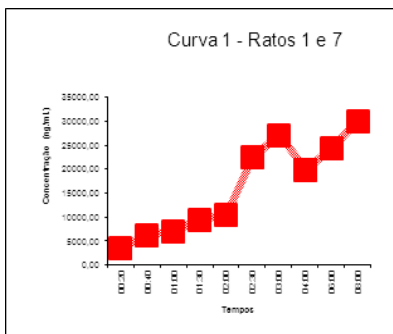
Anexo III
Curvas de Concentração Plasmática em ratos (individuais)
Medicamento TESTE – BE



Curva de Concentração Plasmática em ratas (individuais)
Medicamento REFERÊNCIA - BE



Curva de Concentração Plasmática em ratos (individuais) Medicamento TESTE - NBE



Curva de Concentração Plasmática em ratos (individuais) Medicamento REFERÊNCIA - NBE

